

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie

Direktor: Prof. Dr. med. Ch. Rube

Universitätsklinikum des Saarlandes

**Die individuelle Reparatur von strahleninduzierten  
DNA-Doppelstrangbrüchen in Lymphozyten –  
Implikationen für die radiogene Dermatitis beim Mammakarzinom**

***Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin***

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2011

Vorgelegt von: **Patrick Wilhelm Melchior**

geboren am 20.12.1979 in Saarbrücken



## Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung/Summary .....	6
2.	Einleitung .....	10
2.1.	Synopse der Einleitung und Zielsetzung .....	10
2.2.	Ziel der Arbeit .....	13
2.3.	Grundlagen der Wechselwirkung ionisierender Strahlung auf molekularer Ebene.....	14
2.3.1	DNA-Molekül - Target für ionisierende Strahlenwirkung .....	14
2.3.2	Histonproteine - H2AX .....	15
2.3.3	DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung .....	16
2.3.4	Physikalische Methoden zur Bestimmung von DNA-Schäden.....	17
2.3.5	DSB-Reparaturwege.....	19
2.4.	Erkrankungen mit DNA-Reparaturdefekten .....	26
2.5.	Das Mammakarzinom .....	29
2.5.1	Grundlagen .....	29
2.5.2	Therapie des Mammakarzinoms .....	32
2.5.3	Strahlenbiologie von Normalgeweben - Strahlenbedingte Akut- und Spätnebenwirkungen beim Mammakarzinom .....	35
3.	Material und Methoden .....	39
3.1.	Patientenkollektiv .....	39
3.2.	Strahlentherapeutische Behandlung .....	39
3.3.	Nachsorge .....	41
3.4.	Lymphozytentrennung und Immunfluoreszenzanalyse .....	42
3.4.1	Materialien und Instrumentarium .....	44
3.4.2	Lymphozytentrennung .....	45
3.4.3	Fixierung der Zellen .....	46
3.4.4	Immunfluoreszenzfärbung .....	47
3.4.5	Immunfluoreszenzmikroskopisches (IFM) Verfahren und Quantifizierung der Foci.....	49
3.5.	Quantifizierung der DSB Reparatur .....	50
3.6.	Statistische Auswertung .....	51
4.	Ergebnisse .....	52
4.1.	Studienpopulation und Behandlung .....	52
4.1.1	Vorbehandlung und adjuvante Strahlentherapie (WBRT).....	54
4.2.	Bestimmung der DSB-Induktion und deren Reparaturkinetik in-vivo mit der $\gamma$ -H2AX-Methode .....	55

4.2.1	In-vivo Formation von $\gamma$ -H2AX-Foci nach WBRT .....	55
4.2.2	In-vivo $\gamma$ -H2AX – Foci-Verlust als DSB-Reparaturkinetik nach WBRT.....	58
4.3.	Vergleichende DSB-Reparaturkapazität nach in-vitro Bestrahlung .....	59
4.4.	Streuung und Verteilung von $\gamma$ -H2AX-Foci - Implikation für die Teilkörperbestrahlung und Dosimetrie.....	62
4.5.	Einfluss des Bestrahlungsvolumens auf die Induktion von $\gamma$ -H2AX-Foci und Vergleich der normierten DSB-Reparatur .....	67
4.6.	Radiogene Dermatitis nach WBRT .....	70
4.7.	Assoziation von DSB-Reparatur und radiogener Dermatitis.....	72
5.	Diskussion.....	75
5.1.	$\gamma$ -H2AX Foci Analyse - Prädiktion für die individuelle Radiosensitivität .....	75
5.1.1	Voraussetzung der $\gamma$ -H2AX-Analyse als prädiktiver Test in-vivo und in-vitro.....	75
5.1.2	Grenzen der $\gamma$ -H2AX-Analyse .....	77
5.1.3	Charakterisierung der zellulären Radiosensitivität – Implikation für die akute Radiodermatitis.....	81
5.2.	$\gamma$ -H2AX-Foci – Implikationen für die biologische Dosimetrie.....	86
5.3.	Zusammenfassung und Ausblick .....	90
6.	Abbildungsverzeichnis.....	92
7.	Literaturverzeichnis.....	93
8.	Publikationen .....	110
9.	Danksagung.....	111
10.	Lebenslauf .....	112

## Abkürzungsverzeichnis

53BP1	p53-binding protein 1
ACR	American College of Radiology
ALND	Axilla-Lymphnode-Dissection
AT	Ataxia teleangiectasia
ATM	Ataxia teleangiectasia mutated Gen
ATR	Ataxia teleangiectasia related
Blobs	Lokale Häufung freier Radikale
BRCA1,2	Breast cancer susceptibility protein-1,-2
CK	Carbon-K-Shell
Cs-137	Caesium-137
CT	Computertomographie
CTV	Klinisches Zielvolumen
D 50%	Von der 50%-Isodose umschlossenes Behandlungsvolumen
D 80%	Von der 80%-Isodose umschlossenes Behandlungsvolumen
DAPI	4', 6'-Diamidino-2-phenylindol
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DG	Deckglas
DKG	Deutsche Krebsgesellschaft
DLP	Dosis-Längen-Produkt
DNA	Desoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
DNA-Pk	DNA-Proteinkinase
DNA-Pkcs	DNA-abhängige Proteinkinase
DPC	DNA-Protein-Crosslinks
DSB	Doppelstrangbruch
dsDNA	doppelsträngige DNA
EBCTCG	Early Breast Cancer Trialists Collaboration Group
EGFR	Epithelialer Growth Factor Receptor
ESB	Einzelstrangbruch
EUSOMA	European Society of Mastology
F/Z	Foci pro Zelle
FA	Fanconi-Anämie
FACS	Durchflusszytometrische Analyse
FANCD-2 Protein	Fanconi anemia group D2 protein
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
G0-Phase	Ruhephase der Zelle (gap-Phase)
G1-Phase	Ruhe- / Wachstumsphase der Zelle nach der Zellteilung

G2-Phase	Ruhe- / Wachstumsphase der Zelle vor der Zellteilung
Gy, mGy	Gray, Milligray, Einheit der Strahlendosis
<u>Gy</u> <u>min</u>	Dosisleistung Gray pro Minute
H2A	Histon H2A
H2AX	phosphoryliertes Histon H2A
HNO	Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
HR	Homologe Rekombination
HWZ	Halbwertszeit
IMRT	Intensitätsmodulierte Strahlentherapie
IR	ionisierende Strahlung (ionizing radiation)
kDa	Kilodalton
KPS	Karnofsky-Performance-Score
Ku	Kupfer
kV, keV	Kilovolt, Kiloelektronenvolt
LCIS	Lobuläres Carcinoma in situ
LET	Linearer Energie-Transfer
mA	Stromstärke
Mbp	Megabasenpaare
MDC1	Mediator of DNA-damage checkpoint protein 1
MDS	Multiply damaged sites
MeV, MV	Megaelektronenvolt, Megavolt
MRN	Mre11-Rad50-NBS1
MRN	Mre11-Rad50-NBS1
NBS	Nijmegen Breakage-Syndrom
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung (non-homologous end joining)
nm	Nanometer
N-Status	Nodal-(Lymphknoten-) Status
PBS	phosphatgepufferte Saline Phosphate buffered saline (Puffer)
PBS/NS	Puffer mit Normalserum
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PIKK	Phosphatidyl-3-ähnliche Kinase
PIKK	Phosphatidylinositol-3-ähnliche Kinase
Post-RT	Nach Radiotherapie
PTV	Planungszielvolumen
RBW	Relative biologische Wirksamkeit
RHWZ	Reparaturhalbwertszeit
RI	Reparaturindex RQ

RIF	radiogen-induzierte Foci
R0	Tumorfreier Resektionsrand
RPA	Replikation Protein A
rpm	rounds per minute
RT	Radiotherapie
RTOG/EORTC	Europäische und nordamerikanische radioonkologische Gesellschaften
RTP	Raumtemperatur
SCID	Severe combined immunodeficiency
SEM	Standardfehler
SLNB	Sentinel Lymph Node Biopsie
S-Phase	Synthesephase vor G2-phase
ssDNA	Einzelsträngige DNA
Sv, mSv	Sievert, Millisievert
TEM	Transmission Elektronenmikroskopie
TMN	Tumor, Lymphknoten, Metastasen (TNM Classification of Malignant Tumours)
TRRAP	Transformation/transcription domain-associated protein
UKS	Uniklinikum des Saarlandes, Homburg-Saar
V-(D) J	V - variable, D - diversifying, J – joining
WBRT	Whole breast Irradiation - Ganzbrustbestrahlung
XLf	X-like-factor
XRCC4	X-ray-complementing Chinese hamster gene 4
µm	Mikrometer

Es wurden die üblichen Abkürzungen des SI-Einheiten-Systems verwendet.

## 1. Zusammenfassung/Summary

### ***Zielsetzung***

Die postoperative Strahlentherapie nach brusterhaltender Operation des Mammakarzinom (BET) ist aufgrund der Verbesserung der lokalen Kontrolle, des rezidivfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens ein aktueller Therapiestandard im kurativen Gesamtkonzept. Die überwiegende Zahl der Patientinnen verträgt die fraktionierte Bestrahlung gut, dennoch kommt es in etwa 5-10% der Fälle zu höhergradigen Normalgewebstoxizitäten, welche die Lebensqualität erheblich beeinträchtigen und den Behandlungserfolg limitieren können. Auf zellulärer Ebene gilt der DNA-Doppelstrangbruch (DSB) als die entscheidende primäre Läsion im Rahmen der Schadensantwort nach ionisierender Strahlung. Ursächlich für individuelle Unterschiede in der Strahlensensitivität mit verschiedenen Ausprägungsgraden von Normalgewebstoxizitäten werden vor allem intrinsische Faktoren angenommen, die mit der Erkennung und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) zusammenhängen. In klinischen in-vivo und in-vitro Experimenten an menschlichen Blutzellen sollte der Einfluss der individuellen in-vivo DSB-Reparaturkapazität auf die Inzidenz einer akuten Radiodermatitis bei Patientinnen mit Mammakarzinom untersucht werden, die sich einer postoperativen fraktionierten Bestrahlung der Brust unterzogen. Dabei sollte die Einsatzfähigkeit der Methode in einem klinischen Kontext und dessen translationale Relevanz und potenzielle Eignung als prädiktiver Test hinsichtlich der Verträglichkeit einer strahlentherapeutischen Behandlung dargestellt werden.

### ***Patienten und Methodik***

Untersucht wurden 18 Patientinnen mit Mammakarzinom, bei denen die Indikation zur adjuvanten Radiotherapie der Brust bestand. Die Patientinnen erhielten eine fraktionierte Bestrahlung des gesamten Brustdrüsenkörpers (WBRT), sowie eine Dosisescalation der primären Tumorregion bis zu einer Gesamtdosis von 50 bzw. 60-66 Gy (Einzeldosis 2 Gy, fünf Fraktionen pro Woche). Zur Bestimmung der DSB-Reparatur wurden jeweils im Rahmen der ersten Behandlungsfraction zu definierten Zeitpunkten (vor, sowie 30 min; 2,5 h; 5 h und 24 h) nach in-vivo Strahlenexposition  $\gamma$ -H2AX-Foci, die der Darstellung von DSBs dienen, in Blutlymphozyten ausgewertet. Anhand eines modifizierten RTOG-Summenscores wurden die frühen Strahlennebenwirkungen im Hautbereich (Aspekte Erythem und Desquamation) dokumentiert und mit der DSB-Reparatur verglichen. In einer zweiten Versuchsreihe erfolgte die Messung der  $\gamma$ -H2AX-Foci-Induktion, repräsentativ als DSB-Induktion, und deren Reparatur nach homogenen in-vitro Blutbestrahlungen (90 kV-Röntgenröhre) mit definierten Strahlendosen von 10 bis 500 mGy.



## ***Ergebnisse***

Neun Patientinnen (52,9%) zeigten eine erhöhte klinische Radiosensitivität (Summenscore  $\geq 3$ ), welche sich im Ausmaß unreparierter DSBs 24 h nach Strahlenexposition und in den DSB-Reparaturhalbwertszeiten nicht signifikant von den Patientinnen (n=8) mit niedriger Radiosensitivität (Summenscore  $\leq 2$ ) unterschieden. Sie wiesen jedoch im Mittel größere Anteile dosisbelasteter Brustvolumina ( $V_{(50\%-Isodose)}$ ,  $V_{(80\%-Isodose)}$ ) auf. Bei der Betrachtung der bestrahlten Brustseite (rechts vs. links) zeigte sich ein Trend zur Korrelation von strahleninduzierten  $\gamma$ -H2AX-Foci und Größe bestrahlter Blut- oder Organvolumina. Nach Normierung auf einheitliche Bestrahlungsvolumina konnte dabei keine Patientin mit erhöhtem residualen Focilevel nach 24 h identifiziert werden. Patientinnen mit erhöhtem Maß an unreparierten DSBs nach 24 h, charakterisiert als Reparaturindex RQ oberhalb der einfachen Standardabweichung vom Mittelwert, wiesen jedoch ein erhöhtes Risiko für das Auftreten einer schweren radiogenen Dermatitis auf (n=3).

Die in-vitro Experimente bestätigen im Dosisintervall von 0 - 500 mGy die lineare Dosiseffektbeziehung der  $\gamma$ -H2AX-Foci und erlauben zuverlässig die Erstellung einer in-vitro Eichkurve zur dosimetrische in-vivo Messung strahlenexponierter Blutanteile. Nach Anwendung statistischer Methoden auf die  $\gamma$ -H2AX-Foci-Verteilung in den menschlichen Blutlymphozyten konnte eine Teilkörper- von einer Ganzkörperstrahlenexposition unterschieden werden.

## ***Schlussfolgerung***

Die Methode der Analyse von radiogen induzierten Foci (RIF) ist in der klinischen Praxis auch an einem Patientenkollektiv mit sehr individualisierten Bestrahlungsvolumina in-vivo sicher anwendbar. Sie erlaubt durch die Bestimmung des  $\gamma$ -H2AX Foci-Verlustes eine Bewertung der individuellen in-vivo DSB-Reparatur und die Identifizierung von Patienten mit residualen Foci, repräsentativ für eine verminderte DSB-Reparaturkapazität. Unter den vorbeschriebenen Bedingungen korrelierte das Auftreten der radiogenen Dermatitis nicht direkt mit einer verminderten DSB-Reparatur. In diesem kleinen Patientinnenkollektiv scheint daher die Methode den Ansprüchen eines prädiktiven Tests nicht zu genügen, da sich eine Korrelation zwischen dem individuellem Reparaturverhalten und der Nebenwirkungsinzidenz im Hautbereich nicht direkt abbilden lässt. Dennoch kann die Bestimmung der  $\gamma$ -H2AX-Foci-Ausbeute in Blutzellen als ein hilfreicher quantitativer Biomarker zur Untersuchung einer Niedrig- bis Hochdosisstrahlenexposition im Menschen betrachtet werden.

***Individual repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in lymphocytes - Implications for radiation-induced dermatitis in breast cancer***

**Purpose:** Adjuvant ‚whole breast radiotherapy‘ (WBRT) is the standard of care after breast conserving surgery in women with breast cancer. Throughout different cancer stages the addition of WBRT leads to significantly improved rates of freedom from local failure and overall survival. WBRT is generally well tolerated. A 5-10%–rate of severe acute or long-term side effects is commonly observed. For both radiation-mediated tumor-cell–elimination and induction of side effects, DNA-double-strand-breaks (DSB) presumably play the decisive role. The intensity of normal tissue reactions in radiotherapy can, in part, be attributed to the intrinsic DSB repair-capacity. In this study in vivo and in vitro experiments are carried through in order to assess DSB repair-kinetics in blood lymphocytes of women with breast cancer. These findings are to be correlated with the degree of radiation-induced normal tissue toxicity.

**Patients and Methods:** Eighteen patients with breast cancer, in whom WBRT was indicated, were examined. A total WBRT dose of 50 Gy (single dose 2 Gy) with an additional boost-radiotherapy to the initial tumor-region to a total dose of 60-66 Gy was administered. DSB repair was determined by means of counting  $\gamma$ -H2AX foci in blood lymphocytes at predefined points in time, i.e. before and 0.5 h; 2.5 h; 5 h and 24 h after in vivo irradiation (1st fraction of WBRT) and before and 0.5 h; 2.5 h and 5 h after in vitro irradiation with increasing radiation doses in the range of 10 – 500 mGy. Acute normal tissue toxicity was scored on the basis of a modified RTOG-classification (main aspects were erythema and dry or moist skin desquamation).

**Results:** DSB repair-half-life-times did not differ between patients with a higher or lower than average incidence of acute side effects. In patients with ‘above average’ side effects larger irradiation volumes were treated (volume surrounded by the 50%-isodose). Adjusted for these, no single patients showed elevated residual  $\gamma$ -H2AX foci 24 h after dose-exposure. Patients with a number of residual  $\gamma$ -H2AX foci after 24 h higher than the average + one standard deviation had an increased risk for the development of a severe radiation-induced dermatitis (n=3). In the in vitro experiments, a linear relationship between applied dose and the  $\gamma$ -H2AX foci count could be demonstrated. The in vitro  $\gamma$ -H2AX foci counts also yield calibration-curves, which allow the assessment of the irradiated proportion of lymphocytes in partial-body radiotherapy.

**Conclusions:** In vivo-determination of DSB repair by means of counting  $\gamma$ -H2AX foci can be applied reliably in a clinical situation characterized by an interindividually different partial-body dose exposure. It allows identification of patients with elevated residual  $\gamma$ -H2AX foci-levels, assumedly indicating an impaired DSB repair. The results, even though showing a trend, do not hint at a close correlation between halflife-times of  $\gamma$ -H2AX foci-elimination or residual  $\gamma$ -H2AX foci after 24 h and the incidence of severe acute toxicity. The interpretation of the results is hindered by the limited number of examined patients.

## 2. Einleitung

### 2.1. Synopse der Einleitung und Zielsetzung

Die ionisierende Strahlung ist für eine Vielzahl von Effekten auf menschliche Zellen verantwortlich. Im Mittelpunkt stehen dabei einerseits die Induktion der Tumorentstehung (1,2) in radiogen geschädigten, zuvor gesunden menschlichen Zellen und andererseits die Nebenwirkungen an Normalgeweben, insbesondere im Rahmen der Strahlentherapie onkologischer Erkrankungen.

Die Schädigung der Erbinformation kann durch endogen generierte, reaktiv bedingte oxidative und mechanische Stressoren auf Chromosomen und durch extrinsische Faktoren wie ionisierende Strahlung und Zytostatika entstehen (3,4).

Unter den verschiedensten Möglichkeiten der Schädigung auf zellulärer Ebene (Einzelstrangbrüche, DNA-Basenpaare, DNA-Cross-Links, DNA-Protein-Links) gilt der DNA-Doppelstrangbruch (DSB) als die entscheidende Läsion für die schädigende Wirkung ionisierender Strahlung (5–10) in Bezug auf zytotoxische Effekte (10), Überlebensfähigkeit von Zellen und Induktion von Apoptose oder Mutagenität (4,8,11–14). Dabei können bereits niedrige ionisierende Strahlendosen eine solche DNA-Schädigung auslösen (1,4,9,15,16). In mehrzelligen Organismen kann eine fehlerhafte Reparatur eines DSBs zum Zellzyklusarrest, mitotischem Zelltod oder zur Apoptose führen, wenn dieser zur Inaktivierung eines wichtigen Genprodukts führt (3,17,18). DSBs in Chromosomen können auch endogen während zellulärer Prozesse der DNA-Replikation durch Topoisomerasefehler (19–21) und Meiose spontan auftreten (22,23), oder physiologisch programmierte Prozesse wie die V (D) J-Rekombination initiieren (6,24–27). Bei inkorrektur Reparatur ist durch direkte Induktion oder über Chromosomenabberationen wie Translokation, Inversion und Deletion eine Tumorentstehung (Karzinogenese) möglich (6,18,25).

Erkenntnisse über deterministische Effekte wie akute und chronische Strahlenreaktionen und stochastische Effekte der Tumorentstehung sind insbesondere entstanden aus Untersuchungen der Atombombenüberlebenden von Hiroshima und Nagasaki (15). Dabei ist in der Dosis-Effekt-Beziehung eine statistisch signifikante Zunahme der Wahrscheinlichkeit, an strahlenbedingtem Krebs zu erkranken, erst im mittleren bis hohen Dosisbereich oberhalb von 120 mSv zu beobachten (28,29). Eine Zunahme der Krebsinduktion im niedrigen Dosisbereich unter 200 mSv lässt sich statistisch aufgrund der Schwankungsbreite der spontanen Krebsentstehung und der relativ geringen Wahrscheinlichkeit eines strahlenbedingten Effekts schwieriger nachweisen (28).

Die niedrigsten Strahlendosen, für die ein bereits gering erhöhtes Krebsrisiko angenommen werden kann, liegen im Bereich von 10-50 mGy (30). Die kanzerogene Wirkung sowohl dieser niedrigen Strahlendosen wie sie bei bildgebenden radiologischen Verfahren vorkommen, als auch sehr hoher Strahlendosen von 50-70 Gy in umschriebenen Zielvolumina bei der radiotherapeutischen Behandlung, kann nur durch Extrapolation aus den vorhandenen epidemiologischen Daten von Überlebenden der Atombombenabwürfe über Hiroshima und Nagasaki abgeschätzt werden (31). Anzumerken ist für dieses Kollektiv jedoch, dass die Bestrahlung während und nach der Atombombenexplosion sich sowohl in Intensität mit hoher Dosisleistung und Dosis, wie auch Strahlenart (Neutronenstrahlenanteil) von der radiotherapeutischen Strahlenexposition unterscheidet (28). Damit ist der direkte Vergleich mit diesen Daten nur bedingt möglich.

Die Behandlung mit ionisierender Strahlung in der Strahlentherapie stellt in der Onkologie neben operativen und chemotherapeutischen Therapieverfahren ein effektives Therapieprinzip in der Tumorbehandlung dar. Etwa 50-70% der Patienten mit einer malignen Tumorerkrankung erhalten eine Strahlentherapie in kurativer oder palliativer Intention (32–35).

Aufgrund der biologisch limitierten Strahlentoleranz unterschiedlicher benachbarter Normalgewebe (z. B. Lunge, Herz, Leber, Niere, Rückenmark) kann in vielen Fällen bei Tumoren in ungünstiger Lokalisation keine kurative, tumorizide Strahlendosis appliziert werden (36). Trotz erheblich entwickelter Therapieverfahren, vor allem in der hochkonformalen 3D-Bestrahlungsplanung, und moderner Bestrahlungstechniken, wie beispielsweise der IMRT (Intensitätsmodulierte Strahlentherapie), ist in den meisten Fällen das Normalgewebsrisiko der limitierende Faktor für das Erreichen einer tumoriziden Strahlendosis (36–39). Dabei ist zu beachten, dass bei Patienten, die sich einer strahlentherapeutischen Behandlung unterziehen, eine Vielzahl von intrinsischen und extrinsischen Faktoren die Ausbildung von substantiellen akuten und späten Strahleneffekten an Normalgeweben beeinflusst.

Über 90% der Patientinnen mit Brustkrebs tolerieren die postoperative Strahlenbehandlung gut, wohingegen etwa 5-10% unter gleichen äußeren Behandlungsbedingungen höhergradige akute und späte strahleninduzierte Nebenwirkungen im Verlauf der Therapie aufweisen (40–45). Es gibt eine zunehmende Evidenz dafür, dass die interindividuelle Variabilität in den Normalgewebsreaktionen primär auf eine genetische Prädisposition beispielsweise durch versteckte Mutationen oder einem Polymorphismus in den Genen der strahlenbedingten Zellantwort zurück zu führen ist (46,47).

Es gibt substantielle Erkenntnisse über den Beitrag von extrinsischen Faktoren zur Ausprägung strahleninduzierter Nebenwirkungen. Sie umfassen unter anderem die verordnete Gesamtdosis, die Fraktionierung, die Zielvolumendefinition sowie das Ausmaß der Supportivtherapie und unterliegen größtenteils der Verantwortung des behandelnden Radioonkologen (36,44,48,49).

Im Gegensatz dazu ist die o.g. genetisch bestimmte intrinsische Disposition des individuellen Patienten für eine mehr oder weniger ausgeprägte typische Strahlenreaktion prinzipiell unbekannt (47). Prädiktive Tests zur Abschätzung der zu erwartenden Nebenwirkungen durch solche intrinsischen Faktoren konnten für den klinischen Einsatz bislang nicht etabliert werden. Hypothetisch würde die sichere Prädiktion der Normalgewebstoleranz eines individuellen Patienten das strahlentherapeutische Behandlungskonzept modifizieren. Bei besonders strahlensensiblen Patienten könnte eine überdurchschnittliche Normalgewebsschonung in Kombination mit einer vorsichtigeren (Hyper-)Fraktionierung angestrebt oder sogar die Bestrahlungsindikation zurückhaltender gestellt werden. Patienten mit einer höheren Strahlenresistenz hingegen könnten eine intensivierte Strahlentherapie mit höheren Gesamtdosen und damit assoziierten verbesserten Tumorkontrolle erhalten (50).

Neben Bemühungen in der translationalen Forschung mit dem Ziel der Entwicklung von leistungsfähigen prädiktiven klinischen Tests (wie z.B. dem Gene-Pare Project oder dem ESTRO-GENEPI-Projekt, bei dem genetische Faktoren für die strahlenbedingte Antwort über die Erstellung einer Gewebsdatenbank bestrahlter Patienten untersucht werden), wurde ein erheblicher Fortschritt in dem Verständnis des Reparaturweges nach strahleninduzierten Zellschäden gemacht (51,52).

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Quantifizierung der Reparatur von DNA-DSBs die Bildung von  $\gamma$ -H2AX-Foci in Blutlymphozyten gemessen.

Diese innovative Methode, die sich während der letzten 10 Jahre etabliert hat, basiert auf der Ermittlung von  $\gamma$ -H2AX-Foci<sup>1</sup> in Lymphozyten des peripheren Blutes. Die Effektivität, mit der DSBs repariert werden, bestimmt dabei zu einem großen Teil die Strahlenempfindlichkeit einer Zelle und damit die individuelle Strahlenempfindlichkeit eines Patienten. Aus diesem Grund ist die Bestimmung der in-vivo DSB-Reparaturkapazität eine vielversprechende Möglichkeit, die individuelle Strahlensensibilität eines Patienten vorherzusagen. Hereditäre genetische Erkrankungen, wie die Ataxia teleangiectasia oder

---

<sup>1</sup> Detektion der phosphorylierten Histonvariante H2AX, die als Folge eines DSB-Ereignisses entsteht. Weitere Ausführungen im Kapitel 2.3.2 und 2.3.3.

das Nijmegen Breakage-Syndrom, charakterisiert durch eine Mutation im ATM-Gen, welches eine zentrale Rolle im Reparaturweg von DSBs aufweist, und damit verbundener Schwäche im DNA-Reparaturvermögen, sind mit einer erhöhten klinischen Strahlenempfindlichkeit assoziiert (53–56).

Eine Patientin der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des UKS, die außergewöhnlich schwere akute und späte letale Strahlennebenwirkungen nach einer konventionellen Bestrahlung im Beckenbereich entwickelte, zeigte einen (bislang nicht klassifizierten) Defekt in der Reparatur strahleninduzierter DSBs. Bei dieser Patientin ließ sich eine erheblich erhöhte Anzahl residualer  $\gamma$ -H2AX-Foci in Blutlymphozyten 24 h nach einer Computertomographieuntersuchung<sup>2</sup> nachweisen (15).

Die Analyse der Mechanismen der Doppelstrangreparatur basierten viele Jahre auf der Technik der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) (57,58). Die erforderlichen hohen Strahlendosen beschränkten diese Technik allerdings auf tierexperimentelle bzw. in-vitro Untersuchungen an menschlichen Zelllinien. Die  $\gamma$ -H2AX-Methode hat sich in den letzten 10 Jahre als sensitive Methode zum Monitoring der DNA-Reparatur bei therapeutischen und diagnostischen Strahlendosen etabliert (59–62). Nach Entstehung eines DSBs werden zu beiden Seiten der Bruchstelle H2AX-Histone phosphoryliert ( $\Rightarrow \gamma$ -H2AX), die sich immunfluoreszenzmikroskopisch als Formationen mikroskopisch sichtbarer Kerndomänen („radiogen-induzierte Foci“ (RIF)) nachweisen lassen (1,63–65). Dieses Verfahren bildet in dieser Arbeit die Grundlage für die Quantifizierung der in-vivo und ex-vivo DSB-Reparatur in Blutlymphozytenzellen.

## **2.2. Ziel der Arbeit**

In der vorliegenden prospektiven, klinisch-experimentellen Arbeit soll die Einsatzfähigkeit der dargestellten Methode in einem klinischen Kontext und ihre translationale Relevanz und potenzielle Eignung als prädiktiver Test hinsichtlich der Verträglichkeit einer strahlentherapeutischen Behandlung dargestellt werden. Dabei war es das Ziel, in einem Kollektiv von 18 Patientinnen, die sich einer adjuvanten strahlentherapeutischen Behandlung nach brusterhaltend operiertem Mammakarzinom unterzogen, das DSB-Reparaturvermögen zu ermitteln und mit dem Auftreten akuter dermalen Strahlennebenwirkungen zu korrelieren.

---

<sup>2</sup> im Vergleich zu einem Kollektiv von 14 weiteren Patienten, die sich einer Computertomographie des Thorax- und/oder Abdominal-Bereiches unterzogen.

## **2.3. Grundlagen der Wechselwirkung ionisierender Strahlung auf molekularer Ebene**

### **2.3.1 DNA-Molekül - Target für ionisierende Strahlenwirkung**

Das Desoxyribonukleinsäure-Molekül, kurz genannt DNA, besteht aus 2 Einzelsträngen, die aus Nukleotiden aufgebaut sind. Ein Nukleotid besteht aus einer Base, das über ein Zuckermolekül (Desoxyribose) an eine Phosphatgruppe gebunden ist. Die beiden DNA-Stränge liegen als eine rechtsdrehende Doppelspirale vor, die über Basenbrücken miteinander verbunden sind (Watson-Crick-Modell). Die Spiralstruktur wird durch gegenüberstehende komplementäre Basenpaare (Guanin-Cytosin, Adenin-Thymin) stabilisiert. Die sich daraus ergebende Basensequenz ist Voraussetzung für eine genetische Codierung von Informationen für die Biosynthese von Zellproteinen. Dabei kodiert jeweils eine Basensequenz von 3 Basenpaaren (Triplet) eine spezifische Aminosäure. Es ergeben sich insgesamt 64 verschiedene Möglichkeiten der Zusammensetzung, so dass alle Aminosäuren des menschlichen Organismus kodiert werden können. Die Gesamtlänge der menschlichen DNA beträgt  $\sim 2$  m pro Zelle (66) mit insgesamt ca.  $3 \times 10^9$  Basenpaaren. Sie ist in kondensierter Form auf insgesamt 46 Chromosomen aufgeteilt. Von den 46 Chromosomen werden während der Fortpflanzung und Zellteilung jeweils 23 von väterlicher Seite und 23 von mütterlicher Seite vererbt. Dabei handelt es sich um 22 Autosome und abhängig vom Geschlecht um ein Geschlechtschromosom XX für Frauen und XY für Männer (28,67,68).

Die DNA wird im Zellkern um Histonproteine gewickelt und bildet einen perlenschnurartigen Strang aus Nukleosomen aus (28), der in Form des Chromatins in mehreren verschachtelten Ebenen verpackt wird. Diese Form lässt es zu, dass die Länge von  $\sim 2$  m in einen Zellkern mit einer Größe von  $\sim 10 \mu\text{m}$  verpackt werden kann (66). Diese wird weiter verdichtet, so dass eine locker gepackte Form, das Euchromatin, welches eine hohe Translokationsaktivität besitzt, und eine dicht gepackte Form, das Heterochromatin, die man auch als inaktive Erbinformation (z. Bsp. die Barrkörperchen im Karyoplasma) bezeichnen kann, entstehen. Im letzten Schritt wird die DNA schließlich auf 46 Chromosome aufgeteilt, die in der Metaphase der Zellteilung (Mitose) sichtbar werden (28,68).

Mehrere Untersuchungen konnten in der Vergangenheit einen Anhaltspunkt dafür geben, dass die im Zellkern vorhandene DNA das wesentliche biologische Target für ionisierende Strahlung darstellt. In einem Mikrozellversuch, bei dem zu einem das Zytoplasma und zum anderen der Zellkern mit einem  $\alpha$ -Strahler (Poloniumnadel) unabhängig voneinander bestrahlt wurden, konnte Munro im Jahre 1972 zeigen, dass zur Zellabtötung im



Zytoplasmas wesentlich höhere Strahlendosen als im Zellkern benötigt werden (28).

Darüber hinaus weisen heute bestimmte genetische Erkrankungen wie beispielsweise die Ataxia teleangiectasia, welche mit einer verminderten DNA-Reparaturkapazität einhergeht, eine erhöhte Strahlensensibilität auf (53–56,69). Da die DNA alle genetischen Informationen für die Zelle trägt, können durch äußere Einflüsse z. Bsp. durch chemische Stoffe (Zytostatika) oder ionisierende Strahlung, über die Veränderungen am Biomolekül DNA auf molekularer Ebene Mutationen, Stoffwechselveränderungen und subletale oder letale Zellschäden entstehen. Diese führen bei fehlender Reparatur oder Erholung letztendlich auf zellulärer Ebene zu sichtbaren genetischen Effekten oder akuten bzw. chronischen Strahlenfolgen bis hin zum Tod des Organismus.

### **2.3.2 Histonproteine - H2AX**

Es existieren insgesamt 5 Histonproteine (H1, H2A, H2B, sowie H3 und H4), wobei H2A, H2B und H3 und H4 als Dimere vorliegen. Je vier derartige Dimer-Histonvariationen (zwei H2A/H2B Dimere und zwei H3/H4 Dimere) bilden ein ~100 kDa octamer, scheibenförmiges Nucleosomencore. Die Histonproteine bestehen durchschnittlich aus etwa 100 bis 135 Aminosäuren (66,68).

Um das Nucleosomencore windet sich die DNA in einer Länge von 140–150 (147) Basenpaaren unter Bildung einer flachen linksgängigen Superhelix mit 1,7–1,8 Windungen, wodurch das Nucleosom mit einer Größe von ~ 11 nm entsteht. Insgesamt werden die  $6,4 \times 10^9$  Basenpaare der menschlichen diploiden Zelle durch über 30 Millionen Nucleosomen organisiert. Die Verbindungs-DNA („linker section“) zwischen den einzelnen Nucleosomen ist in der Regel etwa 20–80 Basenpaare lang und mit dem Histon H1 assoziiert. Die Nucleosomenkette bildet eine 30 nm dicke Faser, die dadurch entsteht, dass die Nucleosomenfaser sich spulenförmig mit etwa 6 Nucleosomen pro Windung aufwickelt (66,68).

Für die Nucleosomenanordnung wickelt sich die DNA als erstes um die H3-H4 Tetramere bevor sie zusammen mit den H2A-H2B Dimeren zum Kern komplementieren (66,70). Die 30nm-Faser faltet sich zu vielen Schleifen, an deren Bildung die sog. Nicht-Histonproteine beteiligt sind, was zu einer höheren Kondensationsstufe des Chromatins und der Kernorganisation führt (68). Dadurch wird ein um den Faktor 100 dichter DNA-Strang erreicht (66,71). Um die DNA im Zellkern unterbringen zu können, muss sie im Vergleich zur DNA-Doppelhelix etwa um den Faktor 8000–10000 kondensiert sein (68). Dies wird in den ~ 700 nm großen Metaphasenchromosomen erreicht (66,72). Die hohe Kondensationsform und Organisationsform der DNA ist nicht nur aufgrund der räumlichen Enge im Zellkern,

sondern auch zur funktionellen Nutzung der DNA und deren weiteren Stoffwechselaktivitäten essentiell (73,74). Eine relativ hohe dynamische Stabilität des Chromatins (75) wird durch 142 Hydrogenverbindungen zwischen DNA und Histonproteinen erreicht (66).

### **2.3.3 DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung**

Das Genom von eukaryotischen Zellen ist täglich einer enormen Menge gentoxischer Einflüsse ausgesetzt. Darüber hinaus ist die DNS hochreaktiv und insbesondere gegenüber oxidativen Agenzien empfindlich. Es wird vermutet, dass in jeder der  $10^{13}$  Zellen des menschlichen Körper etwa 10 000 DNA-Schäden pro Tag entstehen (76). Diese Läsionen können die Replikation und die Transkription der Erbinformation blockieren und bei fehlender oder inkorrektur Reparatur zu Mutationen und Genomaberrationen, welche lebende Zellen und den Organismus bedrohen, führen (21).

Die DNA ist in Chromatinproteine eingebettet, die vermutlich einen gewissen Schutz gegenüber DNA-Schädigung bieten. Zusätzlich existieren mehrere Reparatursysteme, die die DNA bei Auftreten eines Schadens in ihren ursprünglichen Zustand zurückversetzen können.

Die direkte und indirekte Strahlenwirkung führt grundsätzlich über chemischen Veränderungen von Proteinen oder Lipidbestandteilen von Membranstrukturen zu einer Vielzahl von Schädigungen an der DNA. Dabei ist die indirekte Strahlenwirkung durch locker ionisierende Strahlung ( $\gamma$ -Strahlung) durch einen intramolekularen Energietransfer mit Bildung von hochreaktiven Radikalen (Wasserradiolyse und Sauerstoffeffekt) charakterisiert. Die direkte Strahlenwirkung durch energiegeladene Teilchen mit hohem linearen Energietransfer (LET) (Neutronen, schwere Ionen und Elektronen) zeichnen sich durch einen direkten Effekt im biologisch kritischen Zielmolekül mittels Ionisationen und Anregungen aus (28,67). Diese Effekte können den programmierten Zelltod (Apoptose) verursachen oder für Veränderungen der genetischen Information (Mutationen) und gegebenenfalls eine spätere Krebsentstehung verantwortlich sein. Dabei ist die Zahl der Schäden, die durch eine Strahleneinwirkung an der DNA erzeugt wird, weit größer als die Zahl der Ereignisse, die zu Mutationen oder zum Tod einer Zelle führen. Berechnungen ergeben, dass 1 Gy einer ionisierenden Strahlung ca. 4000-5000 DNA-Schäden pro Zelle erzeugt (28). Die exakte Ausbeute an strahleninduzierten DNA-Schäden kann jedoch aufgrund der Vielzahl von biochemischen Reaktionen und Reparaturaktivitäten nur annäherungsweise bestimmt werden. Die Ausbeute an strahleninduzierten Schäden steigt linear zur verabreichten Strahlendosis an (4,77–80).

Von der Gesamtheit strahleninduzierter DNA-Schäden stellen die Basenschäden durch irreversible Strukturveränderung einer Base im DNA-Molekül mit etwa 2500-3000 und die Einzelstrangbrüche (ESB) mit ca. 1000 pro Gray und Zelle die häufigste DNA-Schädigung dar. Diese Schäden können durch die Basenexzisionsreparatur oder die Nukleotidexzisionsreparatur behoben werden. Die fehlerhafte Base wird von der Zelle im Rahmen des Zellzyklus erkannt und abhängig von der Base auf dem komplementären DNA-Strang enzymvermittelt durch Polymerasen innerhalb weniger Stunden ersetzt. Da die Reparatur von Basenschäden und Einzelstrangbrüchen relativ fehlerfrei abläuft, stellen diese kein Risiko für die Chromatinintegrität und deren Funktion dar und spielen somit bei strahlenbedingten Folgen keine große Rolle (81).

Seltener treten etwa 150 bis 200 DNA-Kernproteinverbindungen, kovalente Bindungen zwischen Kernproteinen und DNA (DNA-DNA- bzw. DNA-Protein-Crosslinks (DPC)), und etwa 35-40 Doppelstrangbrüche (DSB) pro Gray und Zelle auf (1).

Unter Einwirkung ionisierender Strahlung kann es zu einer inhomogenen Verteilung der Energieabgabe innerhalb der Zelle kommen, so dass es zu lokalen Häufungen von freien Radikalen kommen kann („Blobs“) (5). Finden sich diese Anhäufungen in der Umgebung des DNA-Moleküls, kann es zu Mehrfachschädigungen der DNA kommen, die als „Multiply damaged sites“ (MDS) bezeichnet werden. Diese MDS können neben Basenschäden auch Einzelstrangbrüche (ESBs) enthalten. Befinden sich zwei ESBs an gegenüberliegenden Stellen der DNA-Stränge (nicht mehr als 10 Basenpaare auseinander), kommt es zur Bildung von DSBs (17,21,82), welche zu einem Bruch beider komplementärer DNA-Stränge führen (10,17,28). Untersuchungen zeigen, dass DSBs die entscheidende Läsion nach Einwirkung ionisierender Strahlung in Bezug auf Überlebensfähigkeit der Zelle (21,83–85), chromosomale Instabilität (86) sowie Veränderung von Stoffwechselprozessen und Mutationen sind (87). In eukaryontischen Organismen kann bereits ein DSB zum Zelltod führen, wenn dieser zur Inaktivierung eines wichtigen Genprodukts oder zur Apoptose führt (1,2,16,17).

#### **2.3.4 Physikalische Methoden zur Bestimmung von DNA-Schäden**

Messungen der radiogen abhängigen DSB-Induktion in menschlichen Lymphozyten des Blutes setzen besonders sensitive Untersuchungsverfahren voraus, welche Dosiseffekte unterhalb von 2 Gy detektieren und in der Klinik schnell und reproduzierbar anwendbar sind (80). Die meisten biodosimetrischen und prädiktiven Testverfahren für ionisierende Strahlung basieren auf der Analyse von DNA-Schäden über radiogen induzierte Chromosomenveränderungen (45,88) mit Hilfe von Testverfahren wie das Comet-Assay (89)

und die PFGE (85,90) in peripheren Blutlymphozyten strahlenexponierter Personen und zeigten nur einen moderaten Zusammenhang mit der radiogenen Antwort (80). Frühere Studien zeigten, dass die Anzahl veränderter Chromosomen von der Strahlendosis abhängig ist und für die indirekte quantitative Messung der Strahlenexposition und der Bestimmung des Reparaturausmaßes eines eukaryoten Individuums verwendet werden kann (77). Studien mittels Comet Assay zeigten dabei eine mehr oder weniger gute Korrelation zwischen klinischer Tumor- und Normalgewebsantwort und in-vitro bestrahlter Zellkulturen (89,91).

Ein Nachteil stellt in den meisten Studien im Wesentlichen die weniger sensitive und geringer schadensspezifische in-vitro Kultivierung dar (80). Die Chromosomenanalyse ist darüber hinaus aufgrund der niedrigen Zahl induzierter dizentrischer und ringförmiger Chromosomen in der Auswertung im Niedrigdosisbereich unter 100 mGy limitiert (92,93).

Die klassische Messmethode der Pulsfeldgelelektrophorese stellt seit den 80-er Jahren vor allem die Möglichkeit zur Bestimmung der DSB-Induktion und des DSB-Reparaturausmaßes eines Individuums dar (58,94,95). Nachweislich verschiebt sich mit steigender Strahlendosis die Größenverteilung der DNA-Fragmente zu einem geringeren Gewicht, was durch einen Anstieg der Zahl der DSBs bedingt ist. Umgekehrt kommt es bei der DSB-Reparatur zu einer Zurückverschiebung zum höheren Molekulargewicht (4,96,97). Die durchschnittliche Größe der DNA-Moleküle verhält sich umgekehrt proportional zur Anzahl der DSBs. Eine Abnahme der Fragmentlänge des DNA-Stranges um den Faktor 2 geht mit einer um den Faktor 2 höheren Anzahl von DSBs in der Zelle einher. Demzufolge können über die Zunahme der durchschnittlichen Fragmentgröße und der Größe der DNA-Moleküle das DSB-Reparaturausmaß bestimmt und entsprechende DSB-Reparaturkinetiken untersucht werden. Der Nachteil der klassischen Pulsfeldgelelektrophorese besteht im Wesentlichen in der Größe der detektierbaren DNA-Moleküle. Nur DNA-Fragmente mit einer Größe kleiner als 10 Megabasenpaare (Mbp), konnten mit dieser Methode untersucht werden. Daraus ergibt sich, dass DSB-Studien mit dieser Methode für Strahlendosen oberhalb von 20 Gy limitiert sind, welche mehr als 1000 DSBs in der DNA von menschlichen Zellen produzieren und DNA-Fragmente von über 6 Mbp generieren (4,60).

Im Vergleich zeigen die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-H2AX-Analyse heute im Gegensatz zur PFGE eine gute Übereinstimmung im Niedrigdosisbereich, so dass dieses Analyseverfahren an peripheren mononukleären Zellen und Lymphozyten als sensitives biologisches Dosimeter in vielen Studien von  $\gamma$ -H2AX-Formationen in Patientenblutproben nach diagnostischer und therapeutischer Strahlenexposition etabliert wurde

(1,15,77,80,98,99). Die  $\gamma$ -H2AX-Quantifizierung basiert gemeinhin auf der Fluoreszenzintensität jeder Zelle (1,77,100). Die  $\gamma$ -H2AX Foci Intensität ist dosisabhängig und annähernd linear bis zu einer letalen Dosis von 100 Gy (101,102). Während über die Zeit die Intensität durch die Anzahl phosphorylierter H2AX-Moleküle zunimmt, nimmt die Focizahl durch die DSB-Reparatur mit einer individuellen Reparaturkinetik ab, und weist gegenüber der Intensität eine geringere Variabilität mit der Zeit auf (102).

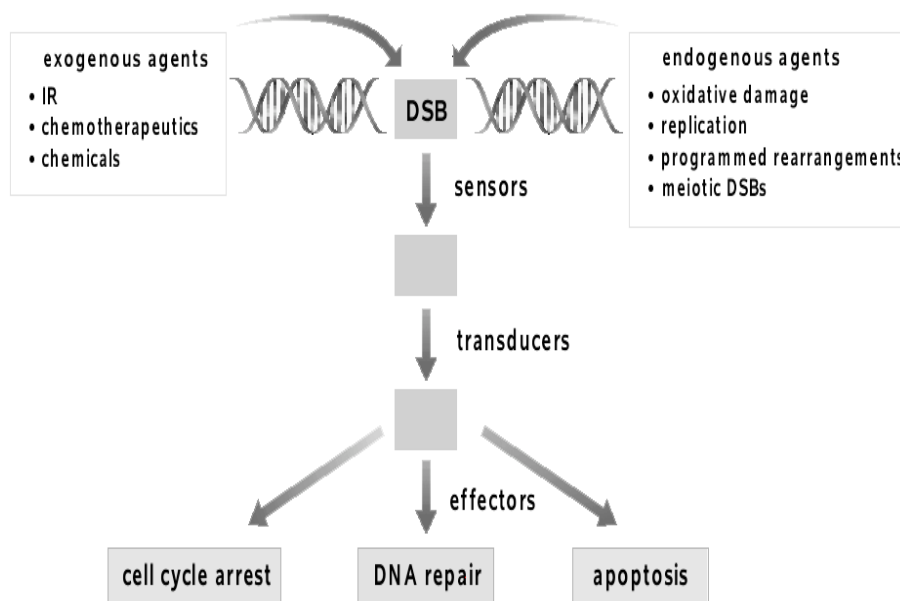
Erhebliche Forschungsbestrebungen konnten in den letzten Jahren zeigen, dass die Phosphorylierung der H2AX-Histonvariation im Zellkern und die Erhebung der radiogen induzierten Foci (RIF), sowie deren Quantifizierung durch die  $\gamma$ -H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie eine etablierte und hoch sensitive Analysemethode zur Messung der DNA-DSB-Induktion und deren Reparaturkinetik in Zellen darstellt, welche verschiedensten gentoxischen Agenzien ausgesetzt waren (1,60,65,66,103). Vorausgesetzt wird allerdings, dass das Vorhandensein von phosphoryliertem Histon H2AX mit dem Vorhandensein eines DSBs korreliert (77). Nach klinisch relevanten Dosen korreliert ihr Auftreten mit induzierten DSBs und der zeitabhängige Foci-Verlust repräsentiert die DSB-Reparatur (1,59,65). Die radiogen induzierten Foci bestehen jedoch nicht nur ausschließlich aus  $\gamma$ -H2AX, sondern werden auch bei der Rekrutierung und Akkumulation von verschiedensten anderen DNA-Reparaturfaktoren in der Umgebung eines DNA-Schadens gebildet. Die Rationale für die Auswertung der RIF-Formationen zur Quantifizierung von DSBs wurde durch eine Reihe von Studien generiert, die zeigten, dass andere Läsionen als DSBs, kein Potential zur Ausbildung von Fociformationen haben. Ähnliche Studien suggerieren, dass die Anzahl der DSBs, abgeschätzt durch die gezählten Foci kongruent zur Extrapolation anderer Methoden sind.

### 2.3.5 DSB-Reparaturwege

Die DSB-Reparatur ist im Vergleich zur ESB-Reparatur aufgrund des fehlenden Komplementärstrangs komplexer und stellt von den vielen Arten der DNA-Schädigung die für die Zelle gefährlichste Läsion dar. DSBs können durch exogene Faktoren wie ionisierende Strahlung oder Chemikalien oder auch durch endogene Faktoren wie beispielsweise bei der DNA-Replikation, Transkription und Meiose entstehen (104).

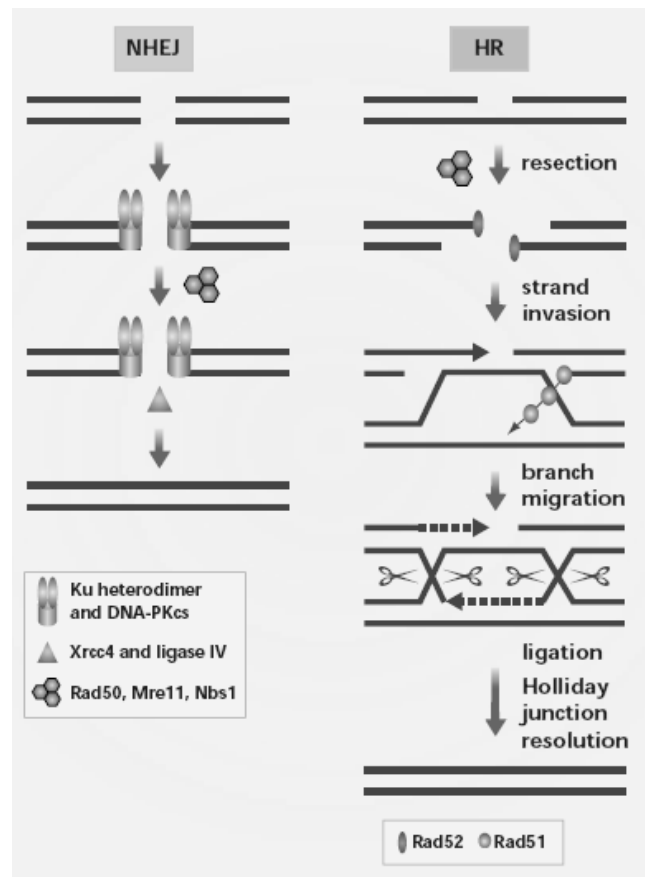
Ein einziger DNA-Strangbruch kann in eukaryoten Zellen eine korrekte Weitergabe von genetischen Informationen verhindern und zum Zelltod führen. Zum Erhalt der Lebensfähigkeit einer Zelle müssen deshalb entstehende DSBs erkannt und beseitigt werden. Die eukaryoten Zellen besitzen dazu mehrere Systeme, die DSBs erkennen und reparieren können. Andernfalls könnte nur der Zellzyklusarrest induziert, der

programmierte Zelltod (Apoptose) oder der mitotische Zelltod die Weiterleitung des schadhafte Genmaterials verhindern. Der eukaryoten Zelle steht zur Erkennung und Beseitigung eines DSBs eine Signal-Transduktionskaskade zur Verfügung. Dabei wird durch Sensorproteine die geschädigte räumlich veränderte DNA- oder Chromatinstruktur erkannt, mit Hilfe von Transducerproteinen verstärkt und an Effektor-Proteine weitergeleitet. Diese interagieren auf zellulärer Ebene miteinander und sorgen für die gezielte Einleitung irreversibler Mechanismen für den Zellzyklusarrest, die Aktivierung verschiedener DNA-Reparaturmechanismen oder die Induktion der Apoptose (siehe Abb. 2.1) (104).



**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung der zellulären Signal-Transduktionskaskade, die nach Auftreten eines DSB abläuft: Sensorproteine erkennen die räumliche Änderung der DNA-Struktur, Transducer-Proteine verstärken das Schadenssignal und leiten es an Effektorproteine weiter (104).

Eukaryonten stehen für die Reparatur von DSBs im Wesentlichen zwei Mechanismen zur Verfügung: zum einen das Nicht-homologe Endjoining (NHEJ) und zum anderen die Homologe Rekombination (HR) (27,104). Beide Wege unterscheiden sich in der möglichen fehlerhaften Prozessierung von DSBs. Die Reparatur durch NHEJ kann fehlerhaft sein, während die HR als sehr akkurat gilt. Dieser Unterschied ist in den Mechanismen der beiden Reparaturwege begründet. Welchen Reparaturweg die Zelle einschlägt, hängt im Wesentlichen von der Zellzyklusphase ab, in der sich die Zelle zum Zeitpunkt des Schadens befindet. In diesem Zusammenhang ist die DNA-Reparaturkapazität eine genetische Eigenschaft, welche die individuelle Empfindlichkeit eines Organismus gegenüber chemischen und physikalischen Agenzien beeinflusst.



**Abb. 2.2:** Reparaturweg der DSBs: Schematische Darstellung der Vorgänge des NHEJ und der HR.

Die NHEJ vereinigt die beiden Bruchenden direkt und führt zu einem kleinen DNA-Sequenzverlust. Es benötigt das DNA-Bindungsprotein Ku, welches die freien Enden der DNA bindet und durch die DNA-PKase ergänzt. Die Xrcc4 und die DNA-Ligase IV werden direkt oder indirekt von DNA-PK Holoenzymen oder durch die DNA-PK-vermittelte Phosphorylierung ergänzend aktiviert. Der Rad 50-Mre 11-Nbs 1-Komplex, welcher Helikasen und exonukleäre Aktivität beinhaltet, spielt wohlmöglich eine Rolle bei der NHEJ bevor die DNA-Enden sich verbinden.

Die HR ist komplexer und rekrutiert zunächst die Rad 52-Gruppe, ein DNA-Endstrangbinding-Protein. Rad 51, bildet ein Nukleoproteinfilament entlang des homologen, unbeschädigten Strangs des Schwesterchromatids aus, um die Stranginvasion zu erleichtern. Das resezierte 3'-Ende dringt in den homologen DNA-Strang ein und wird unter Einwirkung von Rad 54 in 5'-3'-Richtung durch DNA-Polymerasen verlängert; anschließend werden die DNA-Stränge in meiotischen Zellen durch die Ligase 1 ligiert (104).

### ***Nicht-homologes End-Joining (NHEJ)***

Das Nicht-homologe End-Joining (NHEJ) ist der Hauptreparaturweg in den meisten Zellzyklusphasen von Säugetierzellen (23,27,105,106). Das NHEJ erfolgt vor allem während der G0, G1 und der frühen S-Phase des Zellzyklus (27). Daher muss keine unbeschädigte homologe DNA-Matrize als Vorlage verwendet werden. Im Gegensatz zur HR werden die Bruchenden der DNA direkt miteinander verknüpft. Dieser Reparaturweg läuft schnell ab, ist aber fehleranfällig als die HR (107).

Das NHEJ ist nicht nur an der Reparatur strahleninduzierter DSBs beteiligt, sondern spielt auch eine wesentliche Rolle bei der für die Ausreifung und Vielfalt von T-Zellen und Immunglobuline verantwortliche V(D)J-Rekombination (6,24–27). In Untersuchungen an

NHEJ-defizienten Mäusen (DNA-PKcs und Ku70 mutierten Mäuse) konnte man eine hohe Inzidenz an neoplastischen Transformationen, vor allem Leukämie, multiple Myelome, T-Zell Lymphome und Fibroblastentransformationen beobachten. Fibroblasten von Ku-80-null Mäusen zeigten eine erhöhte chromosomale Instabilität, welche mit Chromosomenabberationen assoziiert war (104). Die Schlüsselkomponente des NHEJ-Signalwegs ist das DNA-abhängige Protein Kinase-Holoenzym (DNA-PK), bestehend aus dem DNA-bindenden Heterodimer Ku 70/80, der katalytischen Untereinheit DNA-PKcs (catalytic subunit), dem XRCC4 /Ligase 4-Komplex und dem Artemis und XLF-Protein (14,17,104,108). Die Proteine des NHEJs spielen eine wichtige Rolle in der normalen Genomentwicklung und deren Stabilität, was für die Unterdrückung der Tumorentstehung erforderlich ist (23,109,110). Zellen mit Defekten in einem dieser Gene sind zum einen generell strahlenempfindlicher mit verminderter DSB-Reparatur (111–113) und zum anderen haben sie eine verminderte Aktivität in physiologischen Prozessen der V (D) J-Rekombination mit erhöhter Immundefizienz (4,111,112,114). Das NHEJ scheint im Gegensatz zur HR besonders an der schnellen Reparatur von DSBs beteiligt zu sein (3,100). Die Mehrzahl an radiogen induzierten DSBs ist durch das NHEJ bereits nach ca. einer Stunde repariert (100,115). Die NHEJ beginnt nach Entfernung der geschädigten Nukleotiden mit der Bindung der Reparaturenzyme der DNA-PK, dem Heterodimer Ku70 und Ku80 Protein, an die DNA-Enden. Nach Markierung der DNA Stelle aktiviert und rekrutiert das Ku-Protein die katalytische Untereinheit der DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PKcs), ein 465 KDa großes Polypeptid, welches Phosphatidyl-inositol-3-Kinase Aktivität besitzt (104). Die DNA-PKcs ist verwandt mit der Subgruppe von PI-3 abhängigen Kinasen (PIKK)-Proteinen, wozu das ATM, ATR und das TRRAP gehören. Die DNA-Pkcs aktiviert den XRCC4/DNA-Ligase IV-Komplex. Die DNA-PK und der Kupferkomplex rekrutieren das Artemis-Protein und aktivieren deren Endonukleaseaktivität. Dieses zerschneidet die inkompatiblen DNA-Bruchenden, welche in der Regel unter Einwirkung ionisierender Strahlung entstehen (116). Die NHEJ wird nach erneuter Verbindung der DNA-Bruchenden mittels des DNA-Ligase IV/XRCC4-Komplexes und des XLF-Protein beendet (14,104,107,117). Die NHEJ vermittelte Reparatur läuft, wie bereits erwähnt, ohne homologe DNA-Matrize ab, so dass es nach Verbindung der DNA-Enden durch Deletion oder Insertion zu kleinen Sequenzveränderungen an den Bruchenden kommt (27,28). Die Folgen der NHEJ vermittelten Reparatur sollten jedoch tolerierbar sein. Untersuchungen an menschlichen Zellen konnten zeigen, dass die Gefahr kritische Regionen kodierender Gensequenzen an den Bruchenden im Genom eukaryotischer Zellen zu beschädigen aufgrund der Überlappung von nur 1 bis 4 bp an den Bruchenden, relativ gering ist (27,107,118).



***Homologe Rekombination (HR)***

Die HR scheint im Gegensatz zum NHEJ-Reparaturweg eine eher untergeordnete Rolle bei der Reparatur strahleninduzierter DNA-Brüche in höheren eukaryontischen Zellen zu spielen. Dem HR-Reparaturmechanismus bedienen sich überwiegend niedrige Eukaryoten wie beispielsweise *Schizosaccharomyces* und die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Heute weiß man anhand von Untersuchungen an HR-defizienten Mutanten mit erhöhter Strahlenempfindlichkeit der betroffenen Zelle, dass die HR auch bei höheren Eukaryoten in der Reparatur eine wichtige Rolle besitzt (27).

Die HR bedient sich als Vorlage zur Reparatur homologer DNA-Sequenzen des intakten Schwesterchromatids. Die DSBs können somit fehlerfrei repariert werden. Als Voraussetzung müssen intakte DNA-Sequenzen vorliegen. Die HR kann deshalb erst nach Duplikation der Chromosomen und Vorliegen von zwei homologen Schwesterchromatiden in der G2- und in der S-Phase erfolgen (27). In höheren Eukaryoten sind hauptsächlich die Proteine der RAD-52 Epistasis-Gruppe an dem Reparaturweg der HR beteiligt (119–122). In Hefen (*S. cerevisiae*) wurden diese Proteine besonders gut charakterisiert. Hierzu gehören die Proteine: RAD50, RAD51, RAD52, RAD54, RAD55, RAD57, RAD59, sowie MRE11 und XRS2. Entsprechende funktionelle Homologe wurden auch für höhere Eukaryonten nachgewiesen (104,121).

Zur Einleitung der HR sind neben dem Einzelstrangbindeprotein RPA (replication protein A) (123,124), der Proteine der Rad-52 Epistasis-Gruppe auch ein homologer DNA-Strangabschnitt mit einer Basenlänge von mindestens 200 bp notwendig (125). Zu Beginn der HR lokalisiert ein Komplex aus Mre11, Rad50 und NBS1 den DSB und verknüpft über Rad50 die beiden losen DNA-Enden miteinander, um sie in räumlicher Nähe zu halten (126). Danach beginnt die Bindung von Rad52, welches ähnlich wie Ku eine hohe Affinität zu DNA-DSB-Enden aufweist, an die DNA-Enden, gefolgt von der Initiierung von Rad51 mit Einbringen des intakten homologen Schwesterchromatids. Rad52 schützt dabei die DSB-Enden vor Exonukleaseaktivitäten. Rad 51 interagiert dagegen mit einigen Tumorsuppressorgenen und Zellzyklusproteinen wie p53, Brca1 und Brca2, und sorgt damit für Genomstabilität zum Schutz vor tumorgenetischen Mutationen (104).

Es wird jedoch zunächst ein rekombinantes Zwischenprodukt gebildet. Da das Schwesterchromatid als Matrize fungiert, muss die Reparatur in der späten S-Phase oder G2-Phase stattfinden (27). Die Kernkomponente der HR ist im Wesentlichen die Filamentbildung an die Einzelstrang-DNA durch Rad51 und der anschließende Strangtransfer, welcher durch Rad52 und RPA unterstützt wird. Die 5'-ssDNA-Enden

werden unter Einfluss des Komplexes aus Rad50p, Mre11p und NBS1 exonukleolytisch reseziert, so dass lange 3'-ss-Überhänge entstehen. Dem nun freien 3'-ss-Ende lagert sich das RPA (replication protein) an, welches die Ausbildung von Sekundärstrukturen verhindert (127). Im Folgenden kommt es katalysiert durch Rad51 unter Bildung eines Nukleoproteinfilaments zu einer Invasion des 3'-ssDNA-Endes in den homologen dsDNA-Strang, welcher sich in der G2 oder S-Phase des Zellzyklus auf dem Geschwisterchromatid befindet. Das Nukleoproteinfilament sucht die homologe Sequenz auf dem intakten Geschwisterchromosom und mit Hilfe von Rad54 beginnt die DNA-Synthese in 5'->3'-Richtung. Es gibt dabei die Möglichkeit, dass beide ssDNA-Enden in das homologe Schwesterchromatid eindringen und die Lücke mittels DNA-Synthese und Ligase geschlossen wird. Resultierende Holliday-Junctions werden danach mit oder ohne Cross-over aufgelöst. Dringt dagegen nur ein ssDNA-Strang in das homologe Schwesterchromatid ein, dann erfolgt die DNA-Synthese unter Bildung eines Primer welcher anschließend für den komplementären Strang als Synthesevorlage verwendet wird. Damit ist die Reparatur des DSB abgeschlossen. Bei der Reparatur von kleineren DNA-Lücken erfolgt vor allem die Reparatur ohne Cross-over, wohingegen bei größeren Lücken eine Trennung mit Cross-over bevorzugt wird (128).

### ***HR und NHEJ-Interaktionen***

$\gamma$ -H2AX-Foci Analysen von Rothkamm und Löbrich konnten zeigen, dass der NHEJ-Reparaturweg in allen Zellzyklusphasen einen substantiellen Beitrag in der Reparatur strahleninduzierter DSBs zeigt. Die HR dominierte bei Vorliegen eines intakten Schwesterchromatids im Gegensatz in der späten S und G2-Phase. Rothkamm und Löbrich konnten 2003 zeigen, dass das NHEJ nicht nur der dominante Reparaturweg in der G1-Phase darstellt, sondern auch überwiegend während der S-Phase wichtig erscheint. Rothkamm konnte darüber hinaus nachweisen, dass sowohl der HR als auch der NHEJ-Reparaturweg ihren Beitrag zur Reparatur von radiogen induzierten DSBs während der späten S und G2-Phase leisten (27).

### ***DNA-Schaden und molekulare Antwort***

In den letzten Jahren wurden einige Histon-Modifikationen infolge von DNA-Schäden beschrieben. Die wichtigste Veränderung erfolgt in H2AX, einer Histonvariante von H2A. H2AX ist im Chromatin, abhängig von der entsprechenden Zelllinie, anteilig zwischen 2 bis 25% des H2A-Histonproteine enthalten (64,66,129). Das H2AX-Histon stellte nach dem wissenschaftlichen Nachweis, dass in der Nachbarschaft von DNA-DSB-Schäden eine lokale Phosphorylierung des Moleküls zu  $\gamma$ -H2AX besteht, den Mittelpunkt der Zellantwort auf

eine DNA-Schädigung dar (63,64,66,130). Experimentelle Untersuchungen mit Kombination von Phosphor spezifischen Antikörpern, welche phosphorylierte Serin (139)-Reste am  $\gamma$ -H2AX-Molekül erkennen, und der Immunfluoreszenzmikroskopie, welche die Entstehung von Kern-Foci in der Nachbarschaft von DSBs unter dem Mikroskop erkennbar macht, erlaubt ein Monitoring der Induktion und Reparatur von DNA-Schäden. Die phosphorylierte Variante des H2AX-Histons kann einige Minuten nach Exposition mit ionisierender Strahlung nachgewiesen werden, und erreicht nach etwa 9 bis 30 Minuten ihr quantitatives Maximum (64,66). Es existiert mittlerweile in der Literatur eine gute Evidenz dafür, dass der DNA-Schaden als DSB diese Antwort initiiert (130). Als Ergebnis korreliert die Anzahl der entstandenen  $\gamma$ -H2AX-Foci annähernd mit der Zahl der entstandenen DSBs (1,66).

Die H2AX-Phosphorylierung ist nicht begrenzt auf die unmittelbare Nachbarschaft eines DSBs, sondern breitet sich auf die benachbarte Chromatinregion um den DSB aus. Es wird geschätzt, dass in Säugetierzellen 0,03% der H2AX-Histone durch einen DSB phosphoryliert werden. Nimmt man an, dass der Anteil an H2AX der H2A-Variation etwa 10% im Chromatin beträgt, dann schätzt man die Veränderung im Chromatin auf eine Breite von etwa 2 Mbp, gebildet aus etwa 2000  $\gamma$ -H2AX-Molekülen (64).

Immunfluoreszenzuntersuchungen haben dagegen eine etwa 15-mal größere Region auf dem Chromatin mit mehr als 30 Mbp identifiziert, was für eine nicht kontinuierliche Phosphorylierung von H2AX-Moleküle spricht (63,66,131). Die SQ-Aminosäure Sequenz mit dem Serin 139-Rest ist die bedeutendste Erkennungsstelle für die Phosphatidylinositol-3-OH-Proteinkinasen-Familie (PIKKs) (132). Es existieren prinzipiellen drei großen Kinasenproteine der Proteinkinasefamilie das ATM, ATR und die DNA-Pkcs, von der jede einzelne das Potential zur Phosphorylierung der H2AX-Histone besitzt. Bei genetischen Veränderungen einzelner Kinasen im Rahmen von genetischen Defekten oder Erkrankungen kann jeweils die andere Kinase unabhängig die H2AX-Phosphorylierung durchführen (90,133–135). Von allen PIKKs scheint die ATM-Kinase für die Phosphorylierung der H2AX-Histone am besten geeignet (66,136). Das ATM-Molekül kann unmittelbar in der Nähe von DNA-Schäden das Chromatin verändern. Auf der anderen Seite zeigt die DNA-Pkase über deren Interaktion mit Kupfer-Proteinen nach Bindung an DNA-Enden einen relativ niedrigen Phosphorylierungsrange. Unter physiologischen Bedingungen scheint die Hauptkinase, welche mit der Entstehung von phosphorylierten H2AX assoziiert ist, das ATM-Kinase-Protein zu sein (137–139).

## **2.4. Erkrankungen mit DNA-Reparaturdefekten**

In der Literatur gibt es eine gute Evidenz dafür, dass eine fehlende oder fehlerhafte Reparatur von DSBs zur Ausbildung von Chromosomenabberationen mit resultierender Genominstabilität führt (3). Dadurch kann es zur Ausbildung von Krebserkrankungen, Mutationen und letztlich zum Tod des Organismus kommen. Bei defizienter Reparatur von DSBs kommt es zu einer vermehrten Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung oder DSB-induzierenden Medikamenten. Die meisten Erkrankungen mit einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit zeigen in in-vitro-Blutproben einen vergleichbaren Phänotyp mit erhöhter Sensitivität für ionisierende Strahlung und andere DSB-induzierende Medikamente, Zellzykluscheckpointdefekte oder eine höhere Frequenz von chromosomalen Brüchen und Rearrangements. Pollard et al. publizierten kürzlich eine Übersicht über den Zusammenhang von DNA-Reparaturerkrankungen und erhöhter Strahlenempfindlichkeit und betonten vor allem die Notwendigkeit von prädiktiven präklinischen Tests (140).

### ***Ataxia Teleangiektasia (AT)***

Die Ataxia Teleangiektasia wurde erstmals von Syllaba und Henner 1926 beschrieben. Die AT besitzen einen vielfältigen Phänotyp mit einer ausgeprägten Immundefizienz, einer Karzinomprädisposition, Teleangiektasien (Gefäßneubildungen der Haut), einer Ataxie und der Bewegungsstörung (Apraxie) der Augen sowie eine Neurodegeneration (55,140–142). Die Inzidenz der AT wird auf 1 zu 40 000 in den USA geschätzt (142,143). 1988 konnte das verantwortliche Gen auf dem Chromosom 11q22-23 identifiziert werden (144–146). Dieses Gen wurde ATM-Gen (Ataxia teleangiektasia mutated Gen) genannt. Es ist ein großes Protein (370 kDa) mit Serin und Threoninkinase-Aktivität und wird durch DSBs oder Chromatinstörungen aktiviert (136,145,147). Das ATM-Protein phosphoryliert viele nachgeschaltete Signalproteine, die Zellzykluscheckpoints während der DNA-Reparatur koordinieren, erkennen und Bruchenden der DNA reparieren oder Apoptosewege in geschädigten unreparierten Zellen aktivieren (146).

### ***Nijmegen Breakage Syndrom***

Das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS) ist eine seltene autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die mit einer erhöhten individuellen Radiosensitivität gegenüber ionisierender Strahlung einhergeht. Sie ist phänotypisch gekennzeichnet durch eine Störung des Wachstums, sowie durch eine mentale Retardierung, Mikrozephalie, Gesichtsdysmorphismus, Immundefizienz und eine erhöhte Karzinomprävalenz (148). Die NBS-Patienten zeigen jedoch im Vergleich zur AT keine manifeste Ataxie. Die genetischen

Untersuchungen zeigten bei der Erkrankung eine Mutation in dem NSB1-Gen, welches auf Chromosom 8q21 lokalisiert ist. Das NSB1-Gen kodiert für ein Protein, Nibrin, welches in dem DNA-Reparaturkomplex MRN (Mre 11, Rad50, Nibrin) vorkommt. Alle 3 Proteine werden von ATM über eine Phosphorylierung aktiviert (149). Der MRN-Komplex lokalisiert nach Aktivierung durch die Bestrahlung den Bereich des DNA-Schadens, welcher mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden kann. Ohne Nibrin wird der MRN-Komplex nicht in den Kern der Zelle zur DNA-Reparatur transportiert (150).

### ***Fanconi-Anämie***

Die Fanconi Anämie ist eine autosomal rezessiv vererbte DNA-Reparaturstörung, gekennzeichnet von chromosomaler Instabilität, Anfälligkeit für Tumorerkrankungen und einer erhöhten Radiosensitivität (69). Diese Erkrankung wurde erstmals von Fanconi beschrieben, dessen 2 Brüder von der Erkrankung betroffen waren (151,152). Typische klinische Befunde sind die aplastische Anämie und kongenitale Abnormalitäten, wie Mikrozephalie, Minderwachstum, radiologische Knochenabnormitäten und Missbildungen von Herz und Niere. FA-Patienten zeigen in den meisten Fällen um das 20. Lebensjahr die Entwicklung von soliden Tumoren, wie z. Bsp. Plattenepithelkarzinome des Ösophagus, Oropharynx und der Vulva, versterben jedoch in den meisten Fällen an hämatologischen malignen Erkrankungen, wie z. Bsp. einer Leukämie oder anderen Knochenmarkserkrankungen (153–155). Die Inzidenz der FA liegt bei 1-5/1 Mio. mit einer Frequenz von 1 von 300 Patienten (156). Die FA resultiert aus Mutationen von 1 bis über 13 verschiedenen Genen. Ein Colony-Survival-Assay von lymphoblastären Zellreihen kann bei allen FA-Patienten eine erhöhte Radiosensitivität nachweisen. Darüber hinaus konnte man feststellen, dass die FA-Zellen eine erhöhte Empfindlichkeit bezüglich einiger zytotoxischen Substanzen und DNA-Crosslinks-Agenzien wie Cisplatin und Mitomycin C zeigten (153,156). Dies begründet sich darin, dass 8 der FA-Proteine zusammenarbeiten um das FANCD2-Protein zu aktivieren, welches wiederum BRCA1, BRCA2 und RAD 51 (Reparatur von Cross-Link-Verbindungen) lokalisieren (69,156).

### ***DNA-Ligase IV-Defizienz***

Die NHEJ ist kritisch für die V(D)J-Rekombination während der Lymphozytenreife von T-Zell-Rezeptoren und Immunglobulinen. Eine Störung im NHEJ führt zu einer Immundefizienz, welche mit Leukämie, Multiplen Myelomen und Lymphomen assoziiert ist. In einer homozygoten Mauszellreihe mit Fehlen des DNA-LIG4-Allels konnte eine hohe embryonale Letalität sowie eine hohe Rate an neuronaler Apoptose nachgewiesen werden (112,157). J.M. Pollard verwies darauf in einer seiner Übersichtsarbeit über insgesamt 11 Patienten

mit einer DNA-LIG 4-Defizienz (140). Die Patienten waren phänotypisch durch eine Mikrozephalie, Wachstumsretardierung, Entwicklungsfehler und auffällige Hautveränderungen wie Lichtempfindlichkeit und warzenartigen Veränderungen gekennzeichnet (158). Ein Patient wies eine schwere strahlenbedingte Reaktion im Rahmen der Behandlung einer akuten lymphoblastischen Leukämie, ein weiterer Patient zeigte eine schwere Reaktion auf eine Chemotherapie. Die meisten Patienten zeigten eine ausgesprochene Immundefizienz mit Lymphozytopenie mit rekurrenten Infekten (158,159).

## 2.5. Das Mammakarzinom

### 2.5.1 Grundlagen

#### *Epidemiologie des Mammakarzinoms*

Das Mammakarzinom stellt weltweit die häufigste bösartige Krebserkrankung der Frau mit über 1 Million Neuerkrankungen pro Jahr dar. In der Bundesrepublik Deutschland steht das Mammakarzinom mit etwa 47500 Neuerkrankungsfällen für das Jahr 2000, die etwa 24 % aller weiblichen Tumorerkrankungen ausmachen, in der Liste der Krebsinzidenzen mit Abstand an der Spitze aller bösartigen Tumorentitäten bei Frauen (160). Im Vergleich zu den Daten des Robert-Koch Instituts wird in der aktuellen Publikation des saarländischen Krebsregisters aus dem Jahre 2006 im Saarland im Zeitraum von 2004-2006 ein Anteil der Brustkrebsinzidenz an den Krebsneuerkrankungen von 28,5% und eine Sterblichkeit von 18,1% angegeben (161).

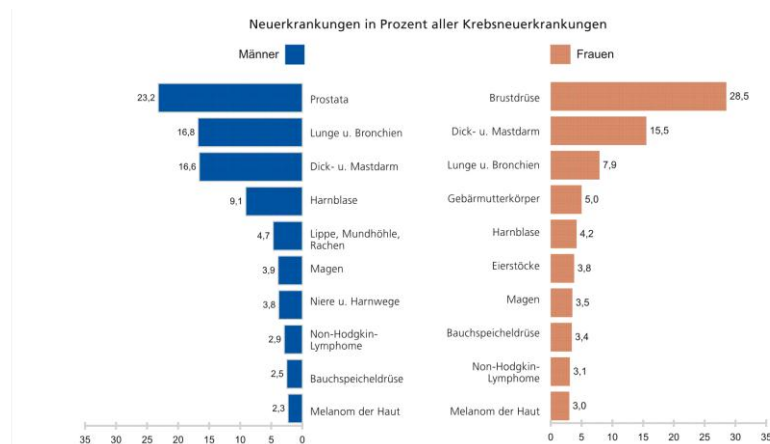


Abb. 2.3: Häufigste Krebsformen im Saarland 2004-2006 – Neuerkrankungen (161).

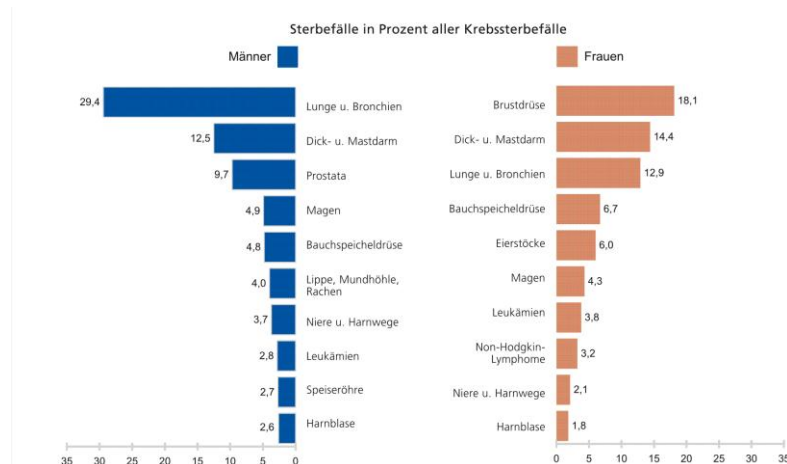


Abb. 2.4: Häufigste Krebsformen im Saarland 2004-2006 – Sterbefälle (161).

Die europastandardisierte Inzidenz von erkrankten saarländischen Frauen wird derzeit mit 107,2/100.000 Einwohner geringfügig höher (+2,9%) als im Bundesdurchschnitt angegeben. Das mediane Erkrankungsalter liegt im Median bei 64,6 Jahre, etwa 4 Jahre früher als im Vergleich zu anderen bösartigen weiblichen Tumorformen. Die kumulative Inzidenz bis zu

einem Alter von 74 Jahren an Brustkrebs zu erkranken, lag 2006 bei etwa 9,1%. Somit erkrankt etwa jede Zehnte saarländische Frau im Laufe ihres Lebens bis zu einem Alter von 75 Jahren an Brustkrebs. Bezüglich der Prognose haben sich die 5-Jahresüberlebensraten in den letzten 30 Jahren kontinuierlich um mehr als 30 % verbessert und erreichen inzwischen im Saarland Raten von etwa 83% (161,162).

Bei der Betrachtung von epidemiologischen Daten von Krebserkrankungen ist zu beachten, dass bundesweite Daten nur geschätzt werden können, da gegenwärtig keine flächendeckenden Krebsregister existieren.

### ***Risikofaktoren***

Grundsätzlich gibt es Hinweise für ein erhöhtes Brustrisiko bei Frauen mit früher Regelblutung, spätem Beginn der Wechseljahre (Menopause), Kinderlosigkeit und spätes Schwangerschaftsalter (>30 Jahre). Mehrere Schwangerschaften in jüngeren Jahren und längere Stillzeiten wirken sich dagegen am ehesten protektiv auf das Brustkrebsrisiko aus. Darüber hinaus spielen ebenfalls genetische Faktoren wie familiäre Belastungen mit jungem Alter und bilateralen Erkrankungen mit Veränderungen des BRCA-1 und BRCA-2 Gens eine wesentliche Rolle. Weitere Risikofaktoren stellen langjährige Hormonersatztherapie nach der Menopause, gutartige Vermehrung von Drüsenläppchen und Bindegewebe (proliferative Mastopathie) und der Einsatz ionisierender Strahlung zum Beispiel im Rahmen einer Strahlentherapie im jungen Erwachsenenalter dar. Darüber hinaus werden auch allgemeine Ernährungsgewohnheiten in Kombination mit verminderter sportlicher Aktivität für ein erhöhtes Tumorinduktionsrisiko angenommen (161–163).

### ***Histopathologie und klinische Ausbreitung des Mammakarzinoms***

Die Lokalisation des Mammakarzinoms ist vorwiegend einseitig unter Bevorzugung des oberen äußeren Quadranten. Primär doppelseitige Mammakarzinome finden sich nur selten in ca. 1% aller Erkrankungen (162).

Beim Mammakarzinom handelt es sich um eine große Vielzahl verschiedener histopathologischer Typen, die sich in ihrem Erscheinungsbild und ihrer malignen Entartungspotenz grundsätzlich voneinander unterscheiden. Man unterteilt die Mammakarzinome in 2 große Hauptgruppen. Auf der einen Seite die nicht-invasiven Karzinome (Präkanzerosen), welche als prä-maligne Form maligne Entartungen hervorrufen können. Auf der anderen Seite stehen die maligne Formen der invasiven Karzinome. Bei beiden Entitäten unterscheidet man prinzipiell das vom Milchgang (Ductus) ausgehende invasiv duktales Karzinom oder duktales Carcinoma in situ (DCIS) und das von den Lappchen (Lobulus) ausgehende lobulär invasive Karzinom oder lobuläres Carcinoma in situ (LCIS).



Ca. 85% aller invasiven Karzinome gehen vom Milchgang aus. Weitere 15% sind lobuläre Karzinome (162). Neben diesen meist soliden oder drüsig aufgebauten Karzinomen gibt es noch verschiedene andere histopathologische Typen mit ungewöhnlicher Differenzierung wie beispielsweise medulläre, papilläre oder schleimbildende Karzinome. Die Ausbreitung des invasiven Mammakarzinoms erfolgt primär lymphogen über kutane, subkutane, fasziale und intramammäre Plexus in die axillären, supra- und infraclavikulären, sowie retrosternalen Lymphknotenstationen. Man unterscheidet im Bereich der axillären Lymphknoten insgesamt drei Lymphknotenlevel. Aufgrund der Häufigkeit des axillären Lymphknotenbefalls ist neben dem Sentinel-Node-Biopsischen-Verfahren zur Detektion abfließender Lymphknotenstationen auch die Axilladisektion von wesentlicher Bedeutung. Bei negativer Sentinel-Node-Biopsie kann je nach Einzelfall auf eine adjuvante Axilladisektion verzichtet werden. Ein retrosternale Lymphknotenbefall entlang der Mammaria-interna-Lymphknotenkette ist selten und ist meistens abhängig von der Tumorlokalisation (inneren Quadranten). Neben der lymphogenen Metastasierung besitzt das Mammakarzinom auch die Tendenz zur hämatogenen Metastasierung vor allem in das Skelettsystem, die Haut, die Pleura, die Lungen, die Leber und das Gehirn (162).

Bei allen invasiven Karzinomen ist grundsätzlich nach kosmetisch brusterhaltender Tumoroperation und neo- bzw. adjuvanten systemischen Therapien die postoperative Strahlentherapie des Restparenchyms der Brust zu empfehlen (164). Die Metastasierungstendenz, das Lokalrezidivrisiko und die Prognose des Mammakarzinoms hängen im Wesentlichen vom Zeitpunkt der Diagnosestellung und vom histologischen Grading ab und sind für das adjuvante Behandlungskonzept von großer Bedeutung. Zur genauen Therapieplanung ist eine Einteilung in Risikogruppen erforderlich. Dies erfolgt nach der Tumorgroße, dessen histologischer Typisierung, dem axillären Lymphknotenstatus (derzeit wichtigster prognostischer und therapierelevanter Parameter), dem histopathologischen Grading, dem Hormonrezeptorstatus und dem Alter. In über 90% der Fälle wird präoperativ die auffällige Mammaläsion durch eine Stanzbiopsie histologisch gesichert und zur Festlegung des TNM-Stadiums ein ausführliches klinisches und pathologisches Staging durchgeführt (165). Das präoperative Vorgehen zur Diagnosesicherung und Tumorstaging wird ausführlich in den interdisziplinären S3-Leitlinien der deutschen Krebsgesellschaft (DKG) und in den Leitlinien der EUSOMA (European Society of Mastology) erläutert und kann im Internet unter [www.leitlinien.net](http://www.leitlinien.net) nachgelesen werden.

In der Gruppe der nicht-invasiven Karzinome besitzt das DCIS im Gegensatz zum LCIS eine höhere maligne Entartungspotenz, die jedoch als echte prämaligne Vorstufe wegen der Beschränkung auf die Basalmembran und fehlendem Anschluss an Lymph- und

Gefäßsysteme in den überwiegenden Fällen keine Metastasierungstendenz besitzt. Dennoch ist auch beim DCIS nach brusterhaltenden Tumoroperationen eine postoperative Bestrahlung des Restparenchyms zur Senkung des Lokalrezidivrisikos indiziert (166–168).

### ***Bedeutung von Rezeptorstatus und Wachstumsfaktoren***

Im Tumorgewebe lassen sich durch immunhistochemische und biochemische Verfahren durch monoklonale Antikörper Hormonrezeptoren nachweisen. Ca. 25% aller Frauen besitzen beide sowohl Östrogen- als auch Progesteronrezeptoren. Bei weiteren 25% nur Östrogen und weiteren 8% nur Progesteronrezeptoren. Das Vorhandensein dieser Rezeptoren macht eine erfolgreich adjuvante endokrine antihormonelle Therapie mit z. Bsp. Tamoxifen, Femara oder Aromasin möglich. Wie auch in anderen Geweben besitzt auch das Brustgewebe epitheliale Zellen, die unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren proliferationsfähig sind. Hierzu gehören beim Mammakarzinom das HER-2-neu Onkogen und der epitheliale Wachstumsfaktorrezeptor EGFR, welche für ein Rezeptorprotein kodieren, das in geringen Mengen in epithelialen und myoepithelialen Zellen des Brustgewebes vorliegen. Da eine Überexpression dieser Onkogene mit einer ungünstigeren Prognose einhergeht, stellen diese Ansatzpunkte für neue innovative Targettherapien dar. Bei diesen Therapien kommen monoklonale Antikörper gegen die o.g. Oberflächenrezeptoren wie beispielsweise Trazuzimab (Herceptin) zur Anwendung (162).

### **2.5.2 Therapie des Mammakarzinoms**

Grundsätzlich ist das Ziel bei der Therapie des primären invasiven Mammakarzinoms die dauerhafte lokale Tumorkontrolle mit Erreichen optimaler onkologischer Endpunkte bezüglich rezidivfreiem Überleben und Gesamtüberleben unter Erhalt eines ästhetischen Körperbildes und der damit verbundenen guten Lebensqualität. Es muss dabei die lokoregionäre Tumorkontrolle durch die Primärtherapie sichergestellt werden, um die Überlebenschancen der Patientinnen nicht zu beeinträchtigen, denn das Lokalrezidiv bedeutet mutmaßlich eine Verschlechterung der Lebenserwartung der Patientinnen (164,165,169). In einer retrospektiven Analyse von 88 Lokalrezidiven an 1620 Patientinnen mit Mammakarzinom resultierte beim Auftreten eines Lokalrezidivs innerhalb von weniger als 5 Jahren nach Erstdiagnose ein insgesamt schlechteres Gesamtüberleben (50,6% vs. 78,8%,  $p < 0,028$ ) (170). Dabei kommt den primären chirurgischen und strahlentherapeutischen Maßnahmen besondere Bedeutung zu. Es handelt sich um Operationsverfahren wie die Wide Local Excision (Tylektomie, Lumpektomie, Tumorektomie), Segmentresektion, Quadrantenresektion, partielle Mastektomie mit oder ohne Sofortrekonstruktion. Bei diesen operativen Verfahren ist grundsätzlich die komplette Exstirpation des Tumors mit einem tumorfreien Resektionsrand (R0) die Basis der Therapie

für alle nicht fortgeschrittenen Mammakarzinome. Darüber hinaus werden diese Verfahren zur Beurteilung des N-Status durch eine Sentinellymphknotenszintigraphie (SLNB= Sentinel Lymph Node Biopsie) und ggf. Axilladisektion (ALND) erweitert. Das SLNB stellt ein minimal-invasives Operationsverfahren dar, bei der der Nodalstatus durch Entnahme von einigen wenigen „Wächterlymphknoten“ (Sentinellymphknoten) bestimmt werden kann. Man geht davon aus, dass die lymphogene Metastasierung kontinuierlich erfolgt, so dass der Sentinellymphknoten, die primäre und potenziell durch das Karzinom infiltrierte Lymphknotenstation darstellt. Das Ausmaß des operativen Eingriffes hängt u.a. von der individuellen Risikofaktoren (Alter, histopathologisches Grading, Tumorausdehnung, Lymphknotenstatus) sowie dem Wunsch der Patientin ab. Bei negativ histopathologischem Sentinel-Node kann auf die klassische Axilladisektion mit Lymphonodektomie der axillären Lymphknoten Level I und II verzichtet werden. Der Nodalstatus stellt dabei den wichtigsten prognostischen und therapielevanten Parameter dar (162,163,165,169,171).

Als Voraussetzungen für eine BET mit anschließender Strahlentherapie sind die ausführliche Aufklärung und das Einverständnis der Patientin, sowie das geeignete Verhältnis von Tumolvolumen und Brustgröße im Hinblick auf das kosmetische Resultat, unabdingbar. Selbstverständlich muss darüber hinaus die technische Durchführbarkeit der postoperativen Strahlentherapie mit deren gerätetechnischen Voraussetzungen (CT, Linearbeschleuniger) am Behandlungsort gewährleistet sein. Daneben sind Kontraindikationen gegen die BET wie z. Bsp. primär multizentrisch invasive Karzinome, ausgedehnte Carcinoma in situ-Anteile, die Ablehnung einer postoperativen Strahlentherapie durch die Patientin, Patientinnen mit Kollagenosen und erhöhter individueller Strahlensensibilität, verbunden mit höherer Toxizität und schlechterem kosmetischem Ergebnis, zu prüfen. In diesen Fällen ist eine modifizierte radikale Mastektomie mit oder ohne Sofortrekonstruktion der Brust zu erwägen (164,165).

Für die Strahlentherapie beim Mammakarzinom wurde in Anlehnung an die S3-Leitlinien der deutschen Krebsgesellschaft (DKG) von der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie (DEGRO) eine spezifische radioonkologische Leitlinie erarbeitet. Diese kann im Internet unter [www.degro.org](http://www.degro.org) eingesehen werden (164).

### ***Stellenwert der Strahlentherapie in der Behandlung des Mammakarzinoms***

Die Strahlentherapie stellt in der Brustkrebstherapie neben der operativen und chemotherapeutischen Behandlung einen essentiellen Baustein des kurativen Behandlungskonzeptes dar. Die BET mit nachfolgender Strahlentherapie des Restparenchyms der Brust (WBRT) stellt derzeit die Standardbehandlung von etwa 80% der

primär operablen Brustkrebspatientinnen in den Frühstadien I und II dar und ist bezüglich des Überlebens als gleichwertiges Therapieverfahren zur modifiziert radikalen Mastektomie zu sehen (172). Die Metaanalyse der EBCTCG (Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group) konnte die Notwendigkeit der Strahlentherapie nach Tumorentfernung herausstellen. Die WBRT nach BET reduziert signifikant die Lokalrezidivrate nach 5 Jahren von 26% auf 7% (173). Sie führt damit im Gesamtkonzept durch die Kontrolle lokoregionärer Rezidive zu einer signifikanten Erhöhung der Überlebensrate (174,175). In prospektiven randomisierten Studien wurden die Ergebnisse einer alleinigen BET mit denen nach einer zusätzlichen postoperativen WBRT der operierten Brust verglichen. Alle Studien zeigten eine signifikante Senkung der In-Brust-Rezidivrate mit Überlebensvorteil im Strahlentherapiearm (173,176). In keiner dieser Studien wurde ein Subkollektiv definiert, das nicht von einer Bestrahlung profitiert hätte. Die lokale Dosisaufsättigung im Tumorbett (Boost) spielt dabei eine wesentliche Rolle. In mehreren Studien konnte der Stellwert der Boostbestrahlung mit signifikanter Senkung der Lokalrezidivrate über 5 bis 10 Jahre nachgewiesen werden. In der Subgruppenanalyse wurde das Alter als bedeutsamster prognostischer Faktor für die Lokalrezidivrate herausgestellt. Demnach zeigte sich der absolute Benefit der Boostbestrahlung bei jüngeren Patienten (< 40 Jahre, ggf. weitere Risikofaktoren G3, N+) deutlicher als bei älteren Patientinnen (23,9% auf 13,5% nach 10 Jahren) (177).

Die postoperative Radiotherapie sollte nach abgeschlossener Wundheilung spätestens 6–8 Wochen nach der operativen Behandlung begonnen werden (178). In mehreren Metaanalysen und einer randomisierten Studie konnten bei verzögertem Beginn der Strahlentherapie von mehr als 8 Wochen höhere Lokalrezidivraten, insbesondere bei Vorliegen zusätzlicher Risikofaktoren (Resektionsränder < 2 mm), aufgezeigt werden (179). Der optimale Zeitpunkt kann jedoch nach aktueller Studienlage bis heute noch nicht grundsätzlich festgelegt werden.

Ist eine systemische Chemotherapie vorgesehen, erfolgt diese sequentiell zur Radiotherapie. In der Regel wird die WBRT ca. 5 bis 6 Wochen nach abgeschlossener systemischer Therapie begonnen (164).

Neben der Indikationsstellung mit Durchsicht der Unterlagen und Aufklärung der Patientin in der Vorstellungsambulanz geht einer täglichen Strahlentherapie eine CT-gestützte 3D-konformale Bestrahlungsplanung voraus. Diese dient dem Strahlentherapeuten und dem Medizinphysiker zur Festlegung der geeigneten Strahlenfelder, Strahlenenergien und Strahlenfeldwinkel, sowie zur Berechnung einer individuellen Dosisverteilung mit

Abschätzung der Dosisbelastung benachbarter Risikoorgane wie beispielsweise Lunge und Herz. In der Planungssoftware können zum einen Dosis-Volumen-Histogramme für die einzelnen Risikoorgane erstellt und die einzelnen Bestrahlungsfelder auf Basis des CT-Datensatzes visuell in Form von digital rekonstruierten Röntgenbilder (DRR) dargestellt werden. Sie dienen bei der täglichen Einstellung der Patientin am Bestrahlungsgerät dem Strahlentherapeuten und der MTRA als Plausibilitätskontrolle bei der Verifikation der Bestrahlungsfelder. Bei der WBRT werden aufgrund der Lage und Form des Brustdrüsengewebes tangentielle Gegenfelder mit Photonengrenzenergien von 6 bis 23 MV eingesetzt. Unter Verwendung von unterschiedlichen Keilfiltern und Blendensystemen (Multi-Leaf-Kollimatoren) kann die Dosisverteilung an das Planungszielvolumen (Brust + Lagerungs- und Atembewegungsunsicherheit) konformal angepasst werden, so dass mindestens die 95%-Isodose das Zielvolumen homogen mit möglichst wenigen Dosisüber- oder Unterdosierungen (Cold- und Hotspots) umschließt. Für die anschließende kleinvolumige Dosiserhöhung im Tumorbett (Boost) wird in den meisten Fällen eine Mehrfeldertechnik mit mindestens 3 Feldern verwendet. In der Regel werden die WBRT und der Boost normofraktioniert mit einer Einzeldosis von 2 Gy, appliziert an fünf aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Die Gesamtdosis ist im Wesentlichen von dem individuellen Risikoprofil der Patientin abhängig und liegt in den meisten Fällen zwischen 50 und 66 Gy.

### **2.5.3 Strahlenbiologie von Normalgeweben - Strahlenbedingte Akut- und Spätnebenwirkungen beim Mammakarzinom**

Trotz heutiger hochkonformaler Behandlungstechniken beinhaltet die Strahlentherapie der Brustdrüse das Risiko von frühen und späten Nebenwirkungen an benachbarten Normalgeweben wie beispielsweise Haut, Herz und Lunge, welche dosislimitierende Faktoren darstellen. Die Strahlentherapie wird von den meisten Krebspatientinnen gut vertragen und führt meist nicht zu schweren intolerablen oder sogar lebensbedrohlichen Nebenwirkungen (45,180). Im Allgemeinen entwickeln mehr als 5% der Patientinnen mit Brustkrebs akute und späte Strahlensymptome mit großer interindividueller Variabilität in der Ausprägung der Normalgewebsantwort (40,41,46,181,182).

Grundsätzlich unterscheidet man vom zeitlichen Verlauf der Strahlenantwort im Normalgewebe zwei Normalgewebsreaktionen, die frühe (akute) Toxizität und die späte Strahlennebenwirkung. Die frühen Nebenwirkungen manifestieren sich nach Erreichen einer gewebsspezifischen Schwellendosis mit einer Latenz unter oder kurz nach Beendigung der Strahlentherapie (37). Sie werden in der überwiegenden Anzahl der Patienten in einem Zeitraum von bis zu 90 Tagen nach Beginn der Behandlung beobachtet und treten

überwiegenden in rasch proliferierenden Geweben oder Gewebsanteilen auf, die einem permanenten Zellumsatz unterliegen (sogenannte Umsatz- oder Mausergewebe (Haut, Schleimhäute oder Knochenmark)) (28,78). Das Kennzeichen der akut reagierenden Gewebestrukturen ist die hierarchische Organisation der Proliferation von der Stammzelle, die in der Lage ist, die Integrität und die gesamte Struktur eines Gewebes ohne Narbenbildung wieder herzustellen, über noch begrenzte Transitzellen zur reifen postmitotischen Funktionszelle (28). Dabei gleicht im Wesentlichen eine permanente Zellneubildung den Zellverlust in einem eingestellten Gleichgewicht aus. Die biologische Grundlage der Strahlenreaktion beruht im Wesentlichen auf einer progressiven Verminderung der Zahl funktioneller Zellen (Zelldepletion) durch strahleninduzierte Hemmung der Zellproliferation, meist begleitet durch sekundäre Entzündungsreaktionen. Durch die Proliferation überlebender Stammzellen und daraus resultierender Restitution der Gesamtpopulation mittels Transitzellen kann eine Abheilung erreicht werden. Durch die Gesamtumsatzzeit (Turnover-Zeit), d.h. der Zeitraum, in dem alle Zellen des Umsatzgewebes einmal ersetzt werden, wird die akute Strahlenreaktion bestimmt. Frühnebenwirkungen heilen demnach nach Beendigung der Strahlenbehandlung sehr rasch ab. Die Latenzzeit bis zur klinischen Heilung mit Wiederherstellung der vollständigen Zellzahl ist abhängig von der Anzahl noch überlebender Stammzellen, und damit von der kumulativen Strahlendosis. Diese Zellpopulation definiert durch ihre intrinsische Strahlenempfindlichkeit der Stammzellen und Zellzahl die Strahlentoleranz eines Gewebes (78).

Späte Strahlennebenwirkungen werden in langsam proliferierenden Geweben (Herz, Lunge, Niere) mit einer symptomlosen Latenz von Monaten bis Jahre beobachtet, welche sich durch hoch differenzierte Zellpopulationen mit spezialisierten Organfunktionen auszeichnen und nur bestimmte Funktionszellen Proliferationskapazität besitzen. Sie führen häufig zu einer nicht reversiblen Chronifizierung wie Fibrose, Atrophie und Gewebsveränderungen mit fehlendem klinischem Ansprechen auf medikamentöse Therapien (37). Die Pathogenese der späten Normalgewebsreaktion ist durch eine diffuse und lokale Schädigung der Mikrovaskularisation des betroffenen Organs gekennzeichnet (183). Die klinische Ausprägung ist von der applizierten Dosis und bestrahlter Organvolumina abhängig (28). Das Risiko zur Entwicklung chronischer Strahlenreaktionen bleibt dabei zeitlebens erhalten (180).

Der radiogen induzierte Zelltod und die Strahlenantwort von Normalgeweben ist ein Ergebnis komplexer Interaktionen von pathophysiologischen Prozessen mit inflammatorischen und fibrogenen Zytokinen, Gewebsumbauprozessen und

Kollagenablagerungen (184,185). Aufgrund der Komplexität der Normalgewebsreaktionen fokussierte sich diese Arbeit allein auf das Auftreten akuter Nebenwirkungen bei der postoperativen WBRT.

Die akute Radiodermatitis ist eine der häufigsten Nebenwirkungen, die man unter der Strahlentherapie der Brust beobachtet. Sie beginnt bei normofraktionierter Bestrahlung in der Regel in der zweiten und dritten Behandlungswoche über eine Schädigung der epidermalen Zellen und Gefäßveränderungen des Korioms unter Verlust der Permeabilität, sowie Ausschüttung inflammatorischer Botenstoffe. Klinisch manifestieren sich in der Dermis zunächst ein Erythem (Rötung) teils mit trockener Schuppung und eine leichte epidermale Atrophie und Funktionseinschränkung von Talg und Schweißdrüsen (Radiodermatitis sicca). Diese Reaktion kann sich im Verlauf zur exsudativen Dermatitis mit Verlust der epidermalen Deckung (Radiodermatitis acuta erosiva), Radiodermatitis acuta bullosa (Flüssigkeitsansammlung zwischen Epidermis und Korium) oder in äußerst seltenen Fällen bis zum nekrotischen Ulkus (Radiodermatitis acuta gangraenosa) verstärken (186,187).

Der Ausprägungsgrad akuter Strahleneffekte an der Haut ist prinzipiell von vielen Faktoren wie Gesamtdosis, Fraktionierungsschemata, Strahlenart und Energie, der Bestrahlungstechnik, dem Volumen bestrahlter Normalgewebe, sowie der intrinsischen Radiosensitivität des Individuums abhängig (186,188). Zusätzliche Noxen können die Ausprägung und den Heilungsprozess akuter Hautreaktionen verstärken. Dies gilt zum einen für zusätzliche antineoplastische Therapien wie Chemotherapeutika und zum anderen im Allgemeinen für das Alter, das Rauchen, chronische Erkrankungen und mechanische Hautreizungen wie beispielweise Kleidung, intensive Hautpflege und (auf Grund von häufigen Dosisspitzen) Hautfalten (186). Dennoch kann man davon ausgehen, dass in 70% der Fälle schwerer radiogener Nebenwirkungen die konkrete Ursache unklar bleibt (40).

Mit vorhandenen Klassifizierungssystemen für Hautnebenwirkungen ist es möglich, radiogene Nebenwirkungen an der Brust zu erheben. 1982 wurde von der Arbeitsgruppe RTOG/EORTC (Europäische und nordamerikanische radioonkologische Gesellschaften) ein Scoringssystem entwickelt, welches heutzutage als modifiziertes Scoringssystem für akute Hautreaktionen in der klinischen Routine etabliert ist (189,190). Es werden darin die radiogenen Früheffekte zur Beschreibung der radiogenen Nebenwirkung (Erythem, Hauttemperatur, Desquamation, Juckreiz, Effloreszenz) spezifiziert. Allgemein erfolgt die Einteilung der Nebenwirkungen nach vier Schweregraden.

***Therapie der akuten Radiodermatitis der Mamma***

Es gibt mehrere präventive Ansätze, um frühe Hautreaktionen zu vermeiden. In den letzten Jahren haben sich aus eigener Erfahrung besonders Hautpuder und Pflegefeuchtlotionen (Dexpanthenollotion, Eucerin-urea-Lotionen), sowie die Vermeidung einer zusätzlichen mechanischen Hautreizung durch Kleidungsstücke oder Waschvorgänge als nützlich erwiesen. Jedoch konnte bis heute keine randomisierte prospektive klinische Studie einen eindeutigen Vorteil einzelner supportiver Maßnahmen zeigen.

Bei fortschreitender Radiodermatitis Grad 2 und 3 hat sich die Anwendung von topischen antibiotisch-/kortisonhaltiger Salbengemische (Diprogenta/Bepanthen) bewährt. Darüber hinaus können exsudative nässende Hautreaktionen (Epitheliolysen) mit Tinkturen wie Eosine- und Pyoktanin-Lösung und Hydrokolloidverbände behandelt werden. Bei höhergradigen Dermatitis (Grad > 3) sind ggf. eine Bestrahlungspause oder eine prophylaktische Antibiotikagabe notwendig.

Neben der Anwendung etablierter prophylaktischer supportiver Maßnahmen sind strahlenbiologisch prädiktive in-vivo- und in-vitro-Tests zur Vermeidung schwerer Strahlennebenwirkungen vor allem zur Identifikation besonders radioempfindlicher Patienten wünschenswert und könnten das therapeutische Ergebnis der Patienten verbessern (37,42,43).



### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Patientenkollektiv

Die experimentelle Studie wurde in Übereinstimmung mit der Helsinki-Deklaration durchgeführt. Alle Patientinnen wurden über den Ablauf der Studie informiert und gaben vor Beginn der Studie ihr schriftliches Einverständnis. Die Studie wurde durch die regionale Ethikkommission (Ärztekammer des Saarlandes) bewilligt. Die Patientinnen wurden im Zeitraum von Mai 2005 bis Dezember 2006 eingeschlossen.

Es wurden Patientinnen zwischen 18 und 80 Jahren mit einem Karnofsky-Performance-Status (KPS) von  $\geq 60\%$  und brusterhaltend operiertem (BET) und histologisch gesicherter Diagnose eines lokal begrenzten und/oder fortgeschrittenen Mammakarzinoms eingeschlossen. Die adjuvante Strahlentherapie (RT) wurde in einer institutionellen interdisziplinären Tumorkonferenz indiziert.

In die Studie nicht eingeschlossen wurden Patientinnen mit akuten oder vorausgegangenen Tumorerkrankungen, wie Leukämien oder Lymphomen, sowie Patientinnen mit einer Vorbestrahlung der betroffenen Mamma. Außerdem, um eine Verfälschung der Messergebnisse zu vermeiden, wurden Patientinnen mit einer diagnostischen Strahlenexposition z.B. durch ein CT oder eine Radionuklid basierte szintigraphische Untersuchung innerhalb von 3 Tagen vor Beginn der Untersuchung ausgeschlossen.

#### 3.2. Strahlentherapeutische Behandlung

Die Strahlentherapie basierte auf einer CT-gestützte Bestrahlungsplanung mit dreidimensionaler Definition von klinischem (CTV) und Planungszielvolumen (PTV), welches durch eine tangential Gegenfeldtechnik unter Verwendung von Multi-Leaf-Kollimatoren, Keilfiltern und teilweise konventionell angefertigten Bleiblöcken umschlossen wurde.

Zur Anwendung kam bei allen Patientinnen nach CT-basierter Bestrahlungsplanung eine konformale Mehrfeldertechnik an den Linearbeschleunigern (MDX™, MXE™ oder KD2™) der Firma Siemens (Erlangen, Deutschland) unter Verwendung von Photonen der Grenzenergie von 6 und-/oder 23 MV. Die Bestrahlung des Brustdrüsengewebes erfolgte in Form von tangentialen Gegenfeldern. Die Boostbestrahlung bestand in den meisten Fällen aus einer 3-Felder-Technik.

Eine Gesamtdosis von 50 Gy wurde auf die erweiterte primäre Tumorregion (Brustdrüsengewebe) und bei metastatisch involvierten tief cervikalen und axillären Lymphknoten zusätzlich auf die supra- /infraklavikulären und axillären Lymphabflusswege verordnet. Anschließend wurde abhängig von der individuellen Risikokonstellation (Alter,

Histologie, Tumorstadium, Grading, Resektionsstatus) der Patientinnen die Gesamtdosis als kleinvolumige Dosisaufsättigung (Boost) in der ehemaligen engeren Tumorregion auf 60 Gy erhöht. Im Falle einer zusätzlich mikroskopisch inkompletten Tumorresektion (R1-Resektionsstatus oder einem Resektionsrand von 1-2mm) wurde die Gesamtdosis auf 66 Gy eskaliert. Die Fraktionierung bestand aus einer Einzeldosis von 2 Gy, appliziert einmal täglich an 5 Tagen pro Woche.

### ***Zeitlicher Ablauf der Strahlentherapie***

Nach Indikationsstellung in der Vorstellungsambulanz wurde ein individuelles Planungs-CT (Elcint-Twin Spiral-CT) des Thorax mit Kontrastmarkierung des Brustansatzes und der Narben, sowie der Mammillenregion angefertigt.

Unter Berücksichtigung der individuellen Beschaffenheit des verbliebenen Brustdrüsengewebes und der Thoraxform wurde vor Beginn der perkutanen Strahlentherapie die Isodosen-Verteilung mit Hilfe der Bestrahlungsplanungs-Software (Philips, Pinnacle<sup>3</sup>) multiplanar dargestellt, wobei das PTV von der 95%-Isodose umschlossen sein sollte. Die Maximaldosis wurde nach den Vorgaben der ICRU-50 auf maximal 107 % der Referenzdosis begrenzt.

Die Gewebebelastung für die Risikoorgane Lunge und Herz wurde im DVH dargestellt, und vor Beginn der Strahlentherapie zur Beurteilung und Freigabe des Bestrahlungsplanes herangezogen. Die maximal zugelassene Organdosis im Rückenmark wurde auf 45 Gy beschränkt. Zusätzlich wurde ebenfalls ein DVH für die anatomische Region des Herzens und herznaher Strukturen wie die großen Gefäße zur Berechnung des bestrahlten Blutvolumens generiert.

Zur Bestimmung des Ausmaßes des individuellen Bestrahlungsvolumens und zur Detektion potentiell interindividueller Unterschiede der bestrahlten Gesamtvolumina wurden für jede Patientin die Volumina gemessen, die von der 50%- (D50) und der 80%- (D80) Isodosenlinie begrenzt wurden. Die zu bestrahlenden Zielvolumina und die gemessenen DSB-Zahlen nach therapeutischer Bestrahlung wiesen interindividuelle Größenschwankungen auf. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden daher die 50- und 80%-Isodose umschlossenen Volumina (V50%, V80%) unter Berücksichtigung des bestrahlten Herz-/Gefäßanteils auf 1000 cm<sup>3</sup> normiert.

Die Patientenlagerung erfolgte in Rückenlage mit eleviertem ipsilateralem Arm. Der kontralaterale Arm wurde an den Körper adduziert, so dass eine möglichst bequeme täglich reproduzierbare Lagerung für die Patientin entstand. Ferner wurden mechanische Lagerungshilfen wie z. Bsp. Armstützen sowie Knie- und Fußstützen eingesetzt.

Unmittelbar vor der Bestrahlung folgte die Simulation, bei der der generierte Bestrahlungsplan und die dazugehörigen Bestrahlungsfelder an einem Simulatorröntgengerät auf die Patientin übertragen wurden.

Zuletzt erfolgte an den Bestrahlungsgeräten die Ersteinstellung mit Verifikationsaufnahmen aller Bestrahlungsfelder zum visuellen Abgleich mit den angefertigten Simulationsaufnahmen. Damit konnte eine korrekte Lagerung der Patientin dokumentiert, überprüft und die exakte Durchführung der Bestrahlung garantiert werden.

### ***Supportive Therapie während der Strahlentherapie***

Alle Patientinnen erhielten während der Strahlentherapie eine standardisierte Hautpflege mit Anwendung von Talkum-Puder. Topische Feuchtigkeitsspendende Lotionen, steroidale-antibiotische Salbengemische, schmerzstillende Medikamente, sowie desinfizierende Lösungen wurden bei höhergradigen Hauttoxizitäten erweitert supportiv angewendet.

### ***Sonstige Therapien simultan zur Strahlentherapie***

Bei einer Subgruppe von Patientinnen mit Risikofaktoren für ein systemisches Rezidiv wurde außerdem eine Chemotherapie nach den aktuell üblichen Schemata in der Gynäkologischen Onkologie (FEC, TAC, EC, CMF, ICE) vor Beginn der RT durchgeführt.

Bei hormonempfindlichen Mammakarzinomen wurde eine adjuvante endokrine Therapie abhängig von deren Hormonrezeptorstatus (Östrogen oder Progesteron) und Menopausestatus eingeleitet. Die endokrine Therapie beinhaltete die Gabe von GnRH-Analoga (Goserelin (Zoladex®), Leuprorelin (Eligard®, Lucrin®)) und Aromatasehemmer (Anastrozol (Arimidex®), Letrozol (Femara®), Exemestan (Aromasin®)) zur Senkung des Östrogenspiegels oder Tamoxifen zur kompetitiven Hemmung des Östrogenrezeptors. Diese wurden zum Teil zeitgleich zur Strahlentherapie begonnen.

## **3.3. Nachsorge**

Die Dokumentation akuter Strahlennebenwirkungen der Haut im Bereich der Brust wurde durch klinisch erfahrene Ärzte der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie einmal wöchentlich bis zum Ende der Strahlentherapie und zusätzlich in definierten Zeitabständen bis 3 Wochen post-RT durchgeführt. Die Ermittlung des Dermatitisgrades basierte auf einem standardisierten modifizierten Scoringssystem der Radiation Therapy Oncology Group of the American College of Radiology (ACR) (189). Jede Evaluation beinhaltete die detaillierte Untersuchung und Dokumentation der Hautveränderungen anhand des unten aufgeführten Scoringssystems.

**Tab. 3.1:** Modifiziertes Scoringssystem für akute Hautreaktionen an der Brust (189).

Aspekt	Score				Max. Summen- Score
	0	1	2	3	
Erythem	kein	leicht	moderat	stark	
Desquamation	keine	trockene Haut	trocken	feucht	
Epitheliolysen	keine	vereinzelt	in Gruppen	konfluierend	
Juckreiz	kein	leicht	moderat	stark	
Hauttemperatur <sup>3</sup>	normal	leicht	moderat	stark	

### 3.4. Lymphozytentrennung und Immunfluoreszenzanalyse<sup>4</sup>

Vor der Studienteilnahme wurden alle Patientinnen über Ziele, Inhalte und den detaillierten Arbeitsablauf in schriftlicher und mündlicher Form durch einen Arzt der Abteilung für Strahlentherapie informiert und aufgeklärt.

Die Untersuchungen wurden an Lymphozyten des peripheren Blutes durchgeführt. Venös gewonnene Blutproben mit peripheren Lymphozyten eignen sich im Allgemeinen besonders gut als Untersuchungsmaterial zur dosimetrischen Messung basierend auf der Bestimmung von  $\gamma$ -H2AX-Foci-Formationen, weil sowohl die Lymphozytenzahl als auch die  $\gamma$ -H2AX-Fociformationen zeitnah zur Strahlenexposition bestimmt werden können (80). In  $\gamma$ -H2AX-Studien an tumor erkrankten Kindern waren dazu nur wenige Milliliter Blut für die  $\gamma$ -H2AX-Analyse ausreichend. Ergänzend sind Lymphozyten im Gegensatz zu beispielsweise durch invasive Maßnahmen gewonnene bukkale Schleimhautzellen nicht direkt Umwelteinflüssen, Ernährungs- und Life-Style Faktoren ausgesetzt, die zu einen erhöhten Hintergrund an DNA-Schäden und  $\gamma$ -H2AX-Foci-Formationen führen (102). Jedoch sind nur etwa 2% aller Lymphozyten überhaupt im peripheren Blut repräsentiert. Der größte Teil ist im hämato-retikulären System wie Thymus, Lymphknoten, Tonsillen, Milz und Knochenmark vorhanden. Etwa 8% der Lymphozyten zirkulieren zwischen diesen Geweben und dem peripheren Blut in einer Zeit von ca. 12 Stunden (92). Schätzungen zufolge entspricht dies einer mittleren Aufenthaltszeit im peripheren Blut von etwa 30 min und

<sup>3</sup> Vergleich mit der kontralateralen Brust.

<sup>4</sup> Gemäß dem experimentellen Ablauf von M. Löbrich et al. 2006: In vivo and repair of DNA double-strand breaks after CT examination.

einer Geschwindigkeit von einigen Dutzend cm pro Sekunde. Diese Charakteristik impliziert, dass Blutproben, welche Minuten und Stunden nach Bestrahlung entnommen werden, demnach eine mittlere Dosis für das periphere Blut reflektieren.

Um den zeitlichen Verlauf der Reparatur der DSBs nach Hochdosisexposition bestimmen zu können, wurde bei jeder Patientin eine Untersuchungsreihe im Rahmen der ersten therapeutischen Mammabestrahlung bei einer Fraktionsdosis von 2 Gy durchgeführt. Dazu wurde zu definierten Zeitpunkten 0 h<sup>5</sup> und jeweils 0,5 h, 2,5 h, 5 h und 24 h nach Strahlenexposition eine Blutentnahme mit einer 9 ml Ammonium-Heparin-Monovette (Firma Sarstedt) entnommen. Die Verwendung der heparinisierten Monovetten verhindert die Gerinnung des Blutes, um eine weitere Verarbeitung zu ermöglichen. Nach der Blutentnahme bei der zu untersuchenden Patientin mit Ammonium-Heparin-Monovetten (9 ml S-Monovetten der Firma Saarstedt) wurde für jede Probe in einem sterilen 15 ml Falcon Reagenzbehälter 3ml heparinisiertes Vollblut mit 6 ml Kultivierungsmedium RPMI 1640 im Verhältnis 1:2 verdünnt.

Parallel zur der oben beschriebenen in-vivo Versuchsreihe wurden Proben ex-vivo mit definierten Strahlendosen im low- und high Dose Bereich (unbestrahlte Kontrollprobe (KT), 10, 20, 40, 100 und 500 mGy) mit Röntgenstrahlen der Energie 90 KV mittels einer Röntgenapparatur der Firma PTW, Deutschland bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Proben für 30 Minuten in einen CO<sub>2</sub>-Wärmeschrank (Hera cell , Sorvall® Heraus von Kendro Laboratory Products: 37 °C, 5 %, CO<sub>2</sub>, 95 % Raumluft) inkubiert. Um einen ausreichenden Gasaustausch und die nötige CO<sub>2</sub>-Zufuhr zu gewährleisten, wurde vor dem Einlagern der Zellkulturen im CO<sub>2</sub> Schrank der Deckel der Falcons nur locker verschraubt.

Für jede Untersuchungsreihe wurde eine individuelle in-vivo und ex-vivo DSB-Reparaturkinetik über den oben genannten festgelegten Messungszeitpunkte (0 h, 0,5 h, 2,5 h, 5 h und 24 h nach der jeweiligen Strahlenexposition) erstellt. Der Messzeitpunkt nach 24 h wurde in der ex vivo-Versuchsreihe nicht durchgeführt. Bereits mehrere Versuche im Institut für Biophysik der Universität des Saarlandes konnten in der Vergangenheit zeigen, dass eine lange Kultivierungszeit des Blutes im CO<sub>2</sub>-Wärmeschrank im Vergleich zu in-vivo Versuchsreihen zu keinen verlässlichen Ergebnissen geführt hat.

---

<sup>5</sup> Vor Bestrahlung zur Erhebung der Ausgangswerte (sog. Kontrollprobe).

### 3.4.1 Materialien und Instrumentarium

Sämtliche experimentelle Arbeitsschritte wie Vorbereitung und Herstellung der verwendeten Chemikalien und Lösungen, Kultivierung von Blutzellen, Lymphozytentrennung, Medienwechsel und Waschvorgänge, sowie das Auftragen der Zellen auf sterile Deckgläser wurden unter aseptischen Arbeitsbedingungen an einer Sterilwerkbank Hera Safe (Heraus-Sorvall® von Kendro Laboratory Products GmbH) durchgeführt.

**Tab. 3.2:** Chemikalien

Nährmedium	RPMI 1640 + 10%FCS + 1% Penicillin/ Streptomycin
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
PBS-Pufferlösung	Phosphat-Bufferet-Salin autoklaviert
Normalserum Ziege (NSZ) 1%	inaktiviert 30 Minuten bei 56 °C; steriltfiltriert; aliquotiert zu 5 ml in 15 ml Falconröhrchen
Lymphozytentrennmedium	Ficoll 400 LSM 1077 PAA Laboratories GmbH
Primärantikörper	Anti-phospho-H2AX (Ser139), clone JBW301 Upstate Lake Placid in 1:800 Verdünnung mit PBS/1%FCS
Sekundärantikörper	Alexa Fluor 488 goat anti mouse IgG (H+L) 2 mg/l 1:400 Verdünnung mit PBS/1%FCS
Methanol	
Aceton	
Gelatine 0,1%	
Mounting Medium	Vectashield Hard Set Mounting Medium mit Dapi (4',6'-diamidino-2-phenylindole); (Vector Laboratories, Burlingame, CA)
Objekträger und Objektdeckgläser	
Nagellack	

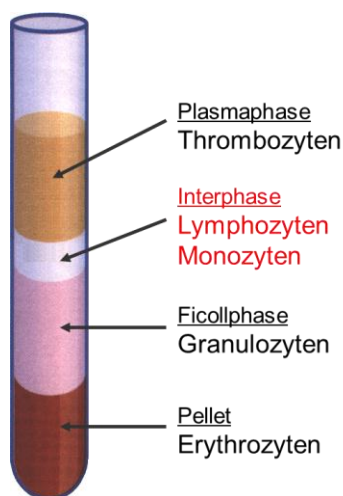
**Tab. 3.3:** Geräte

In-vitro Bestrahlungseinheit	M23342-751 (7,5kV-100kV) oder M23331-453 (70kV-1MV) (PTW, Germany)
In-vivo Bestrahlungseinheit	MDX, MXE und KD2 der Firma Siemens mit 6 oder 23 MV
Zentrifuge	Centrifuge 5804/5810 R von Eppendorf
Mikroskop und Zubehör	Auflicht-Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse E600. Ausstattung mit drei Epifluoreszenzfiltersystemen. Folgende Filter kamen zum Einsatz (EX: Anregungsfilter; DM: Dichroic mirror, Beamsplitter; BA: Barrier filter oder Emissionsfilter (EM)):  DAPI (4', 6'-Diamidino-2-phenylindol): EX 340-380; DM 400. BA 435-495.  60-er Ölobjektiv
Aufnahme und Bearbeitung von Bildern	Digitalkamera für Mikroskope (Nikon Digital Sight, DS-2 MBWc) mit Software von Nikon, Düsseldorf, Germany

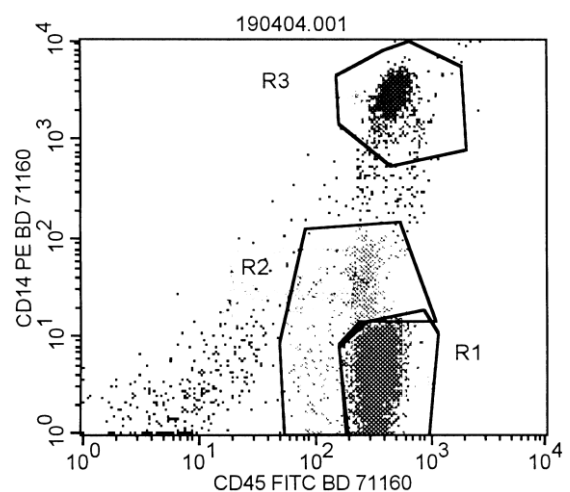
### 3.4.2 Lymphozytentrennung

Das Verfahren zur Isolierung der peripheren Blutlymphozyten wurde anhand der Vorgaben der PAA Laboratories GmbH durchgeführt.

Das verwendete Trennmedium zur Lymphozytengewinnung (LSM1077) ist eine Trennlösung auf der Basis von Ficoll® 400. Ficoll® 400 ist ein hydrophiles Polymer mit einem Molekulargewicht von 400 000 Dalton. Es wird für die Produktion von Dichtegradienten zur Trennung von Zellen und subzellulären Komponenten verwendet, die aufgrund von Schwerkraft während des Zentrifugierens sedimentieren. Das in der Versuchsreihe verwendete Trennmedium weist eine höhere Dichte als die zu trennenden Substanzen (Blutlymphozyten von anderen Blutbestandteilen) auf.



a)



b)

**Abb. 3.1a:** a) Lymphozytentrennung, b) Durchflusszytometrie (FACS).

Die leichten Thrombozyten verbleiben in der Plasmaphase, während die Lymphozyten und Monozyten sich in einer weißlich erscheinenden Interphase zwischen Plasma und Ficollphase anreichern. Granulozyten und Erythrozyten aggregieren und diffundieren dadurch entlang ihres Dichtegradienten durch die Ficollschicht nach unten und bilden das sogenannte Pellet (rot-braune Phase am Gefäßboden aus korpuskulären Bestandteilen). Der Zellrasen der Interphase kann mittels einer sterilen Pasteurpipette abgezogen werden. Die Zellpopulation wird daraufhin mit Pufferlösung gewaschen, um Ficollreste zu entfernen.

Löbrich et al. konnten in der Durchflusszytometrischen Analyse (FACS)<sup>6</sup> der Interphase zeigen, dass sie aus etwa 80% Lymphozyten ( 60% CD4, 15% CD8, 5% CD 19, 15% Monozyten und 5% Granulozyten) besteht, so dass sich diese Methode der Lymphozytengewinnung für unsere Versuchsreihe als sinnvoll erwiesen hatte.

Zur Gewinnung der Interphase wurden zunächst 6 ml Lymphozytentrennmedium (LSM1077) in einem 15 ml Falcon Reagenzbehälter vorgelegt und kurz bei 200g in einer Zentrifuge anzentrifugiert, um darin enthaltende verunreinigende Stoffe durch Sedimentieren zu entfernen. Danach konnten 6 ml des zuvor verdünnten Vollblutes vorsichtig über das Trennmedium geschichtet werden, so dass 2 Phasen entstehen. Um die detaillierte Auftrennung zu gewährleisten, muss darauf geachtet werden, dass keine Durchmischung der Medien erfolgt. Die Proben werden bei 1200g ohne Bremse in einer Temperatur gesteuerten Zentrifuge (Centrifuge 5804/5810 R von Eppendorf) 20 Minuten bei 25°C zentrifugiert. Anschließend wurde die Intermediärschicht (siehe Tab. 3.1) mit Hilfe einer Pasteur-Pipette abgesaugt bis der Interphase -Zellrasen komplett entfernt war und die gewonnenen Zellen bei RTP in drei aufeinander folgenden Waschschritten und jeweils 10-minütigem Zentrifugieren bei 300g und 200g konzentriert und von Ficollresten gereinigt. Der Waschvorgang erfolgte dabei nach Aufratschen des entstandenen Pellets (= konzentrierter Bodenbelag aus Lymphozyten) unter Zugabe von 5 ml PBS Pufferlösung.

In der Zwischenzeit wurden sterile Deckgläser (DG) in einer ihrer Zahl entsprechend geeigneten Petrischale ausgesetzt und mit 1%-iger Gelatine 30 Minuten bei Raumtemperatur (RTP) inkubiert, der restliche Überstand abgesaugt. Danach trockneten die DG bei Raumluft an.

### **3.4.3 Fixierung der Zellen**

Das Aufbringen der Lymphozyten auf sterile Deckgläser erfolgte mit nach dem 3. Waschschr. entstandenen Pellets, welche mit 170µl PBS gemischt und in einer Laborpipette resuspendiert wurden. Dabei wurde jeweils 100µl auf die sterilen Deckgläser

---

<sup>6</sup> Abb. 3.1. a (b).



verteilt, auf denen sie für 6 Minuten bei RTP inkubierten. Die Fixierung und Permeabilisierung der Lymphozyten erfolgte für 30 Minuten durch Zugabe von 4 ml 100%-iger Methanol-Lösung pro Welleinheit in einer 6-Well Platte und anschließend 1 Minute in 100%-igem Aceton bei -20°C.

Anschließend wurden die Deckgläschen mit 5 ml PBS, pH 7.4 und Zusatz von 1%-Normalserum der Ziege dreimal 10 Minuten auf einem Wippeltisch mit 20 rpm gewaschen und im Anschluss bei RTP mit 5 ml PBS+ 1% NS 30 Minuten inkubiert, um unerwünschte Nebenreaktionen an den Zellen zu blockieren.

### **3.4.4 Immunfluoreszenzfärbung**

#### ***Prinzip***

Das Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung beruht auf der Eigenschaft eines Primärantikörpers an einem zu markierenden Antigen zu binden. Unter Verwendung eines mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) versehenen Sekundärantikörpers wird dieser Primärantikörper markiert. Durch Licht bestimmter Wellenlängen wird unter dem Fluoreszenzmikroskop das Fluorochrom angeregt, woraufhin Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben werden. Bei Rückkehr des Elektrons auf sein Ausgangsenergieniveau, wird Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert. Jeder Farbstoff hat dabei spezielle Charakteristika bezüglich der Wellenlängen des Anregungslichtes und des Emissionslichtes. In dieser Arbeit wurde der an Antikörper gekoppelte Farbstoff Alexa Fluor 488 verwendet, welcher Licht mit einer Wellenlänge von bis zu 495 nm<sup>7</sup> absorbiert und es mit einer Wellenlänge von bis zu 519 nm<sup>8</sup> emittiert (191). Zur Anregung der Fluoreszenz diente ein Licht der Wellenlänge von 488 nm eines Auflicht-Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse E600, das mit einer Digitalkamera zur Dokumentation und einem 60-iger Öl-Emmisions-Objektiv zur optischen Analyse ausgestattet war.

#### ***$\gamma$ -H2AX-Färbung***

Wie in der Einleitung (Kap. 2) dargestellt, ist die  $\gamma$ -H2AX-Färbung eine Immunfluoreszenzfärbung mit deren Hilfe man phosphorylierte H2AX-Histone ( $\gamma$ -H2AX) in Zellen nach niedrigen Bestrahlungsdosen nachweisen kann. Damit ermöglicht sie eine hochsensitive Quantifizierung von strahleninduzierten DSBs in humanen Lymphozyten des peripheren Blutes oder anderer DNA tragender Zellen wie Fibroblasten, Testis, Lungengewebe etc. (1,63,64).

---

<sup>7</sup> angegebenen ist das Absorptionsmaximum.

<sup>8</sup> angegebenen ist das Emissionsmaximum.

### ***Primärantikörper***

Der Antikörper wurde zunächst im Verhältnis 1:800 in PBS/NS verdünnt, gevortext und anschließend für 60 sec. bei 13000 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5804/5810R von Eppendorf). Zur Inkubation wurden auf die zellbehaftete Seite des Deckgläschens 40µl verdünnter Primärantikörper (anti- $\gamma$ -H2AX monoklonales Mausserum (Upstate, Lake Placid, NY) gegeben und für mindestens 12 h in einer feuchten Kammer<sup>9</sup> bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben dreimal 10 Minuten in PBS + 1% NSZ gewaschen.

### ***Sekundärantikörper***

Der Sekundärantikörper wurde im Verhältnis 1:400 mit PBS/NS verdünnt, gevortext und für 60 sec. bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde pro Deckglas 80 µl des verdünnten Sekundärantikörpers (Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (Molecular Probes, Oregon, USA) aufgetragen und die Proben für 1 Stunde lichtgeschützt bei RTP inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Deckgläser zunächst viermal mit 5 ml PBS bei RT lichtgeschützt gewaschen.

Bevor die Deckgläser auf die Objektträger aufgebracht wurden, wurde darauf zunächst jeweils 3 µl Mounting Medium mit DAPI (H-1500, Vectashield® Hard Set Mounting Medium with DAPI; Vector Laboratories, Kalifornien, USA) aufgebracht um die Proben mit DAPI gegenzufärben und im Mounting Medium auszuhärten. Die DAPI-Färbung dient vor allem der visuellen Darstellung von Zellkernen mit darin enthaltender DNA und lagert sich dabei bevorzugt an AT-reiche Regionen an (192). Wird DAPI durch ultraviolettes Licht (360nm) angeregt, fluoresziert es mit blauer bis cyaner Farbe (460nm). Aufgrund der Emission von DAPI am kurzwelligen Ende des sichtbaren Lichtspektrums (blau) ist es in-vitro möglich weitere Fluoreszenzfarbstoffe (Sekundärantikörper wie Alexa Fluor 488) mit verschiedenen Emissionsmaxima ohne Signalüberschneidungen am selben Präparat einzusetzen (193,194).

Die Färbung hilft in der Auswertung bei der Abgrenzung einzelner Zellkerne vom Hintergrund und somit zur besseren Zuordnung der  $\gamma$ -H2AX-Foci zu einer Zelle.

Nach der Trocknung über mindestens 12 Stunden bei 4 °C konnten die Deckgläser am darauf folgenden Tag mit handelsüblichem Nagellack versiegelt werden, um sie vor Austrocknung zu in den darauffolgenden Tagen schützen.

Die Probenauswertung ist bei lichtgeschützter Lagerung im Kühlschrank bis zu zwei Wochen möglich.

---

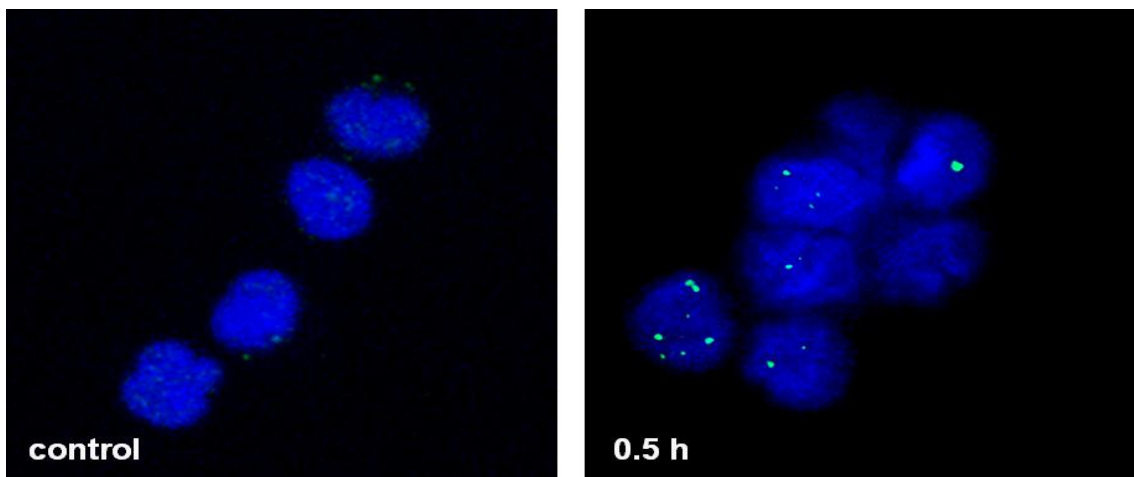
<sup>9</sup> Petrischale mit feuchtem Filterpapier.

### 3.4.5 Immunfluoreszenzmikroskopisches (IFM) Verfahren und Quantifizierung der Foci

Bei allen Untersuchungsreihen wurde zur Quantifizierung der DSBs und Bestimmung der fluorochrommarkierten  $\gamma$ -H2AX-Histone das Immunfluoreszenzmikroskopische Verfahren<sup>10</sup> mit dem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse E600 verwendet. Dieses ist ausgestattet mit drei Epifluoreszenzfiltersystemen. Bei der Auswertung der Blutzellproben kamen folgende Filter zum Einsatz (EX: Anregungsfilter; DM: Dichroic mirror, Beamsplitter; BA: Barrier filter oder Emissionsfilter (EM): DAPI (4', 6'-Diamidino-2-phenylindol): EX 340-380 nm. DM 400 nm. BA 435-495 nm. Das Mikroskop ist weiterhin mit einer Digitalkamera und der entsprechenden Software von Nikon zur Aufnahme und Bearbeitung von Bildern ausgestattet.

Die quantitative Analyse der Foci erfolgte unter Benutzung eines 60-er Ölvergrößerungsobjektivs (siehe Abb. 3.1b).

Die unten aufgeführte Abb. 3.1 zeigt, dass bereits vorhandene Foci (in einer Kontroll-Probe) als auch durch radiodiagnostische (CT-Diagnostik) oder strahlentherapeutische Verfahren induzierte  $\gamma$ -H2AX-Foci im low- und high-Dose Bereich (10, 20, 40, 100, 500 mGy) untersucht und quantifiziert werden konnten.



**Abb. 3.1b:** Immunfluoreszenzmikroskopisches Verfahren von Lymphozytenkernen.

Sichtbare Lymphozytenzellkerne nach Fixierung und Färbung mit DAPI. 30 Minuten nach Strahlenexposition detektierbare DSBs nach Zugabe eines fluoreszierenden sekundären Antikörpers anhand der leuchtenden H2AX-Foci im Zellkern. In der Kontrollaufnahme ohne Strahlenexposition treten durch die natürliche Strahlenbelastung im Vergleich nur wenige spontane  $\gamma$ -H2AX-Foci in den Lymphozytenkernen auf.

<sup>10</sup> entwickelt am Institut für Biophysik des Uniklinikums des Saarlandes.

Die  $\gamma$ -H2AX-Foci-Zahl wurde durch das Zählen einzelner Fluoreszenzpunkte innerhalb des Lymphozytenzellkerns für jede Probe ermittelt. Dafür mussten mindestens 40 Zellen und 40 Foci pro DG ausgewertet und jeweils der Mittelwert gebildet werden.

### 3.5. Quantifizierung der DSB Reparatur

Der  $\gamma$ -H2AX-Foci-Verlust repräsentiert in Individuen die DSB-Reparatur und residuale  $\gamma$ -H2AX-Foci eine erhöhte Radiosensitivität (15).

Um das Ausmaß der individuellen DSB-Reparatur unseres Patientinnenkollektivs zu erfassen und vergleichen zu können, wurde ein Reparaturquotient (RI) eingeführt, der die Interpretation des Reparaturverlaufs erlaubt. Die Anzahl der noch vorhandenen residualen  $\gamma$ -H2AX-F/Z nach 24 Stunden (nf 24h) wurde ins Verhältnis zur initialen Foci-Induktion nach 30 Minuten (nf 0.5h) gesetzt. Dieses Verhältnis wurde als Reparatur-Quotient („Repair index“ (RI):  $RQ_{total} \triangleq \frac{24\ h}{0,5\ h} = \frac{nf\ 24\ h}{nf\ 0,5\ h}$ ) beschrieben. Dieser stellt den

Gesamtverlust an  $\gamma$ -H2AX-Foci während der Messperiode von 24 Stunden und ist damit Ausdruck einer möglichen DSB-Rekombination.

Die  $\gamma$ -H2AX-Foci-Reparaturkinetiken wurden zusätzlich unter Anwendung einer biphasisch-exponentiellen Regressionsanalyse mit der Formel

$$y = A \cdot \exp\left(-\frac{x}{t_1}\right) + B \cdot \exp\left(-\frac{x}{t_2}\right)$$

gefittet.

DiBiase und Yokota et al. beschrieben, dass die  $\gamma$ -H2AX-Foci-Kinetik aus einer biphasisch exponentiellen Funktion mit einer schnellen und langsamen Reparaturkomponente besteht (195). Die Konstanten  $t_{\frac{1}{2},\ schnell}$  und  $t_{\frac{1}{2},\ langsam}$  der mittleren Lebensdauer der  $\gamma$ -H2AX-Foci, welche die Geschwindigkeit der DSB-Rekombination bestimmt, wurden berechnet.

Für die Halbwertszeit der schnellen und langsamen DSB-Reparatur gilt:

$$HWZ\ (schnell; langsam) = \ln 2 \times t_{\frac{1}{2}}\ (schnell; langsam)$$

Die Halbwertszeit stellt die Zeit dar, bei der der Anteil an unreparierten  $\gamma$ -H2AX-Foci auf die Hälfte reduziert wird.

### **3.6. Statistische Auswertung**

Die Auswertung der Patientendaten und Erstellung der Diagramme erfolgte mit Hilfe von Microsoft® Excel und dem zugehörigen statistischem Zusatzprogramm WinSTAT® für Microsoft® Excel.

Mit Hilfe einer Verteilungsanalyse unter Verwendung des Dispersions-Index-Tests wird die Abweichung der gemessenen  $\gamma$ -H2AX-F/Z-Verteilung zum Zeitpunkt 30 Minuten von einer Poissonstatistik gezeigt (196,197). Dies demonstriert, dass im Falle der Brustbestrahlung nur ein Teil der zirkulierenden Lymphozyten im Sinne einer Teilkörperbestrahlung strahlenexponiert sind (77). Der Test wurde mit Hilfe der Software Dose Estimate, Version 3.0 (Chilton, United Kingdom) durchgeführt.

Die exponentielle Regressionsanalyse zur Bestimmung der Halbwertszeiten der langsamen und schnellen DSB-Reparaturkomponente erfolgte mit Hilfe der Software Origin®, Version 8.

Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) berechnet und graphisch dargestellt. Nach Testung auf Normalverteilung mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests für kontinuierliche Variablen wurde ein unabhängiger t-Test zur Beurteilung der statistischen Unterschiede durchgeführt. Signifikante Unterschiede wurden bei einem p-Wert kleiner als 0,05 gegeben.

Die statistische Auswertung wurde mit WinSTAT® für Microsoft® Excel, Version 2007.1 (Robert K. Fitch) erstellt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Studienpopulation und Behandlung

Insgesamt wurden in der Studie 18 Patientinnen ausgewertet, die im Zeitraum von Mai 2005 bis Dezember 2006 an der Klinik für Strahlentherapie und Radionkologie des UKS eine adjuvante Strahlentherapie der Brust bei Mammakarzinom erhielten. Eine Patientin (DD21) wurde aufgrund fehlender Daten nach Abschluss der Datenerhebung von der Studie ausgeschlossen. Die Analyse der Blutprobe nach der therapeutischen Bestrahlungsfraction war bei dieser Patientin nicht möglich.

Die Basisdaten der Patientinnencharakteristika sind in Tab. 4.1 zusammengefasst. Daraus geht hervor, dass der KPS der behandelten Patientinnen einen Score  $\geq 80\%$  aufwies. Hinsichtlich der primären Tumorlokalisation wurde bei 5 Patientinnen (29%) die linke Brust und bei 12 Patientinnen (71%) die rechte Brust bestrahlt. Im Mittel waren die Patientinnen  $55 \pm 11$  Jahre alt in einem Intervall von 39 bis 78 Jahre. Die Verteilung der tumor- und histopathologischen Befunde bestätigt eine vergleichbare Inzidenz aus der Literatur mit 76% invasiv duktalem, 6% invasiv lobulärem, 12 % invasiv-duktulo-lobulärem und 6% muzinösen Karzinomanteilen. Das Tumorstadium war mit 65% (n=11) im Stadium pT1, 29% (n=5) im Stadium pT2 und 71 % (n=12) negativen Nodalstatus (N0) lokal begrenzt. Bei einer Patientin war eine Aussage über das lokale Tumorstadium nicht möglich (pTx). Der Lymphknotenstatus zeigte in 30% (n=5) eine lokoregionäre Metastasierung in die axillären Lymphknoten. Nach der TMN-Klassifikation ergab sich ein Nodalstatus N1 und N2.

Tab. 4.1: Demographische Basisdaten und Patientencharakteristika

Patientencharakteristika und Diagnosen	Alle Patienten (n=17)
<b>Alter, Jahre</b>	
Mittel	55
Standardabweichung	11
Range	39-78
<b>Primäre Tumorlokalisation - Anzahl (%)</b>	
Mamma rechts	5 (29)
Mamma links	12 (71)
<b>Tumorpathologie - Anzahl (%)</b>	
invasiv duktal	13 (76)
invasiv lobulär	1 (6)
invasiv duktulo-lobulär	2 (12)
muzinös	1 (6)
<b>Tumorstadium - Anzahl (%)</b>	
T1mic	1 (6)
T1b	2 (12)
T1c	8 (47)
T2	5 (29)
Tx	1 (6)
<b>Lymphknotenstatus- Anzahl (%)</b>	
N0	12 (71)
N1	4 (24)
N2	1 (6)
<b>Karnofsky-Performance-Score - in (%)</b>	
70	0
80	4 (24)
90	12 (71)
100	1 (6)

#### 4.1.1 Vorbehandlung und adjuvante Strahlentherapie (WBRT)

Bei allen 17 Studienteilnehmerinnen wurde im Vorfeld eine brusterhaltende Tumorchirurgie (BET) durchgeführt. Bei positivem axillärem Lymphknotenstatus, in den überwiegenden Fällen im Sentinel-Node-bioptischen Verfahren nachgewiesen, wurde bei 14 Patientinnen zusätzlich eine Axilladisektion vorgenommen. Im Anschluss wurde das Patientinnenkollektiv abhängig vom individuellen Risikoprofil (Tumorstadium, Menopausal-, Lymphknoten-, Resektions- und Hormonrezeptorstatus) einer adjuvanten systemischen Chemotherapie zugeführt. Detaillierte Angaben zur Therapie wurden in der Tab. 4.2 zusammengefasst.

**Tab. 4.2:** Therapie nach Brusterhaltender Operation (BET)

Therapie nach BET	Alle Patienten (n=17)
<b><i>Hormontherapie</i></b>	
ja	13 (76)
nein	4 (24)
<b><i>Chemotherapie</i></b>	
ja	13 (76)
nein	4 (24)
<b><i>Strahlentherapie (Gy)</i></b>	
Mittel	60
Standardabweichung	3
Range	50-66

In Tab. 4.2 ist dargestellt, dass insgesamt 76% (n=13) vor Beginn der Strahlentherapie eine adjuvante Chemotherapie erhielten. Bei hormonempfindlichen Mammakarzinomen wurde in 76% (n=13) eine adjuvante endokrine Therapie durchgeführt. Diese wurden zum Teil zeitgleich zur Strahlentherapie begonnen. Auf eine detaillierte Auswertung hinsichtlich der verschiedenen Chemo- und endokrinen Therapiekonzepte wurde aufgrund der Vielfalt in diesem Zusammenhang verzichtet.

Die adjuvante Ganzbrustbestrahlung (WBRT<sup>11</sup>) wurde mit einer mittleren Referenzdosis von 50 Gy durchgeführt. Anschließend erfolgte eine lokale kleinvolumige Dosisaufsättigung im

<sup>11</sup> Whole breast irradiation (Ganzbrustbestrahlung).



Tumorbett als Boost abhängig von dem individuellen Risikoprofil (Resektionsstatus) mit einem Range von 10 bis 16 Gy mit resultierender Gesamtreferenzdosis von 60 bzw. 66 Gy. Im Mittel ergab sich eine verabreichte Dosis von 60 Gy  $\pm$  3 Gy mit einem Intervall von 50 bis 66 Gy. Bei einer Patientin wurde bei mehr als 4 positiven axillären Lymphknoten (N2) außerdem eine Bestrahlung der supra- und infraclavikulären, sowie der axillären Lymphabflusswege bis zu einer Dosis von 50 Gy durchgeführt. Die Strahlentherapie wurde normofraktioniert mit einer Einzelreferenzdosis von 2 Gy einmal täglich an 5 Tagen pro Woche durchgeführt.

#### **4.2. Bestimmung der DSB-Induktion und deren Reparaturkinetik in-vivo mit der $\gamma$ -H2AX-Methode**

Die  $\gamma$ -H2AX-Foci-Methode besitzt das Potential DNA-DSB-Schädigungen und deren Reparatur im Rahmen von bildgebenden Verfahren wie einer CT-Diagnostik in Lymphozyten von Patienten zu untersuchen (15). Dafür wird nicht unbedingt eine zusätzliche externe in-vitro Bestrahlung benötigt, sondern es ist vielmehr möglich einen Strahlenschaden direkt in-vivo zu quantifizieren. In dieser Arbeit wurde, anders als in früheren Studien, im Rahmen einer Ganzbrustbestrahlung (WBRT) die Formation der  $\gamma$ -H2AX-Foci und das Ausmaß der DNA-DSB-Reparatur in Blutlymphozyten von Patientinnen mit Mammakarzinom untersucht. Dafür wurde mit Hilfe dieser Immunfluoreszenzmikroskopischen Methode die phosphorylierte Histonvariation H2AX bestimmt und für jede Patientin die DNA-DSB-Reparatur als Nachweis für die individuelle intrinsische Radiosensitivität, *in-vivo* bestimmt. Die Auswertung der Immunfluoreszenzproben erfolgte in-vivo als auch in-vitro durch das Auszählen der  $\gamma$ -H2AX-Foci pro Zellkern.

##### **4.2.1 In-vivo Formation von $\gamma$ -H2AX-Foci nach WBRT**

Zur Bestimmung der DSB-Induktion, definiert als Scheitelwert postradiogen entstandener DSBs in Blutlymphozyten, wurde im Rahmen der WBRT mit Megavoltphotonenstrahlung und einer Dosis von 2 Gy die Anzahl der  $\gamma$ -H2AX-Foci nach einer Reparaturzeit von 30 min gemessen. Ergänzend wurde zu den Zeitpunkten 2,5 h, 5 h und 24 h post-RT in-vivo die Focizahl gemessen und eine Kinetik des  $\gamma$ -H2AX-Foci-Verlusts über einen Zeitraum von 24 Stunden aufgezeichnet. Zur Prüfung der klinischen Relevanz als klinisch prädiktiver Test zur Identifizierung von DSB-Reparaturdefizienten Patientinnen vor Strahlenexposition wurde das Patientinnenkollektiv über den Zeitraum der Strahlenbehandlung klinisch beobachtet und die Hauttoxizitäten im Bestrahlungsfeld dokumentiert. Retrospektiv konnte nach Abschluss der Datenerhebung das Patientinnenkollektiv in zwei Gruppen mit leichter und schwerer Hauttoxizität eingeteilt werden. Die mittlere  $\gamma$ -H2AX-Foci-Zahl pro Zelle wurde durch das Zählen einzelner Fluoreszenzpunkte („Foci“) innerhalb der Lymphozytenzellkerne

für jede Probe ermittelt, wobei mindestens 40 Zellen und 40 Foci pro Deckglas ausgewertet und jeweils der Mittelwert gebildet wurde. Tab. 4.3 zeigt die gemessene Anzahl an  $\gamma$ -H2AX-F/Z zu den verschiedenen Zeitpunkten als Mittelwert über alle Patientinnen eingeteilt in Gruppen mit leichter und schwerer Hauttoxizität.

**Tab. 4.3:**  $\gamma$ -H2AX Foci-Zählung

	Anzahl von Foci/ gezählte Lymphozyten* ( $\pm$ Standardfehler)				
	Kontrolle*	0.5 h†	2.5 h†	5 h†	24 h†
Alle Patientinnen (n = 17)	0,06 ( $\pm$ 0,006)	0,71 ( $\pm$ 0,08)	0,35 ( $\pm$ 0,06)	0,16 ( $\pm$ 0,04)	0,07 ( $\pm$ 0,008)
Leichte Toxizität ‡ (n = 8)	0,07 ( $\pm$ 0,01)	0,72 ( $\pm$ 0,10)	0,32 ( $\pm$ 0,04)	0,13 ( $\pm$ 0,01)	0,09 ( $\pm$ 0,01)
Schwere Toxizität ° (n = 9)	0,05 ( $\pm$ 0,01)	0,68 ( $\pm$ 0,12)	0,37 ( $\pm$ 0,12)	0,18 ( $\pm$ 0,07)	0,05 ( $\pm$ 0,01)

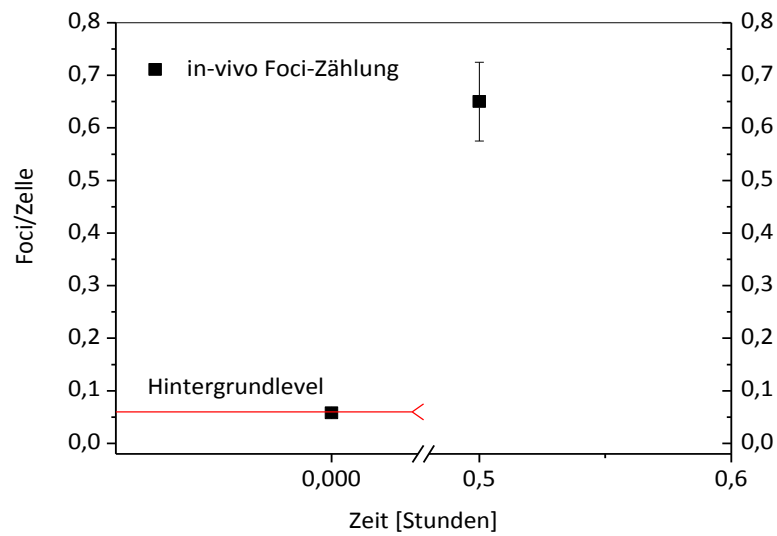
\* 3 Kontrollproben wurden vor der Bestrahlung entnommen und wurden zusammen mit den Proben zu den Zeitpunkten 0,5 h, 2,5 h und 5 h nach Bestrahlung ausgewertet. Hier wird der Mittelwert über die 3 Kontrollproben angegeben.

† Im Gegensatz zu der graphisch dargestellten Reparaturkinetik wurde der Hintergrund (Kontrolle) nicht subtrahiert.

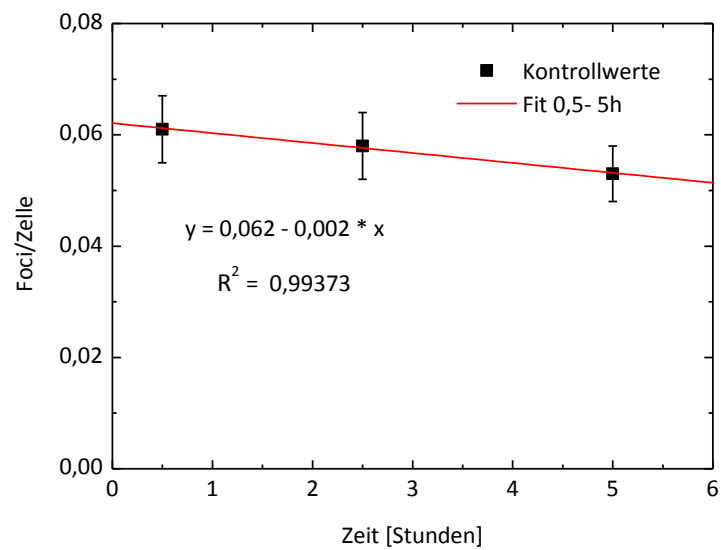
‡ Leichte Toxizität wurde definiert nach RTOG-Summscore  $\leq$  Grad 3.

° Schwere Toxizität definiert als RTOG-Summscore  $\geq$  Grad 3.

Wie aus Tab. 4.3 und in Abb. 4.1 ersichtlich, wurde innerhalb der ersten 30min nach der WBRT mit 2 Gy ein Anstieg der  $\gamma$ -H2AX-F/Z gemessen. Die Induktion an  $\gamma$ -H2AX-F/Z lag nach Abzug der Hintergrundwerte mit  $0,65 \pm 0,075$  F/Z (Range 0,15 bis 1,4) etwa 8 bis 10-mal höher als die Kontrollwerte vor Strahlenexposition. Die Kontrollwerte stellen den natürlich vorhandenen Hintergrund an  $\gamma$ -H2AX-Foci in unbestrahlten Blutproben dar. Der Mittelwert der Kontrollwerte aller Patientinnen betrug  $0,06 \pm 0,006$  F/Z (Range 0,02 - 0,1). Die Abb. 4.2 zeigt die Anzahl der Foci von drei unabhängigen Kontrollproben (als Mittelwerte) zu Reparaturzeitpunkten (0,5, 2,5 und 5 h) mit einer geringen Abweichung von  $\pm 0,006$  F/Z zwischen den einzelnen Kontrollproben. Im Rahmen der Messgenauigkeit und statistischen Schwankung zwischen den Einzelmessungen kann der Hintergrund (Kontrollwert) als konstant angesehen werden.



**Abb. 4.1:**  $\gamma$ -H2AX Foci-Induktion nach 30min: Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) nach 2 Gy WBRT über alle Patientinnen. Der Hintergrund an Foci (rote Baseline) wurde von der gezählten Focizahl subtrahiert.



**Abb. 4.2:**  $\gamma$ -H2AX Foci-Hintergrundwerte:  
Drei Kontrollproben wurden vor der Bestrahlung entnommen und zusammen mit den Proben zu den Zeitpunkten 30min, 2,5h und 5h nach Bestrahlung ausgewertet. Angegeben ist der Mittelwert der Kontrollproben aller Patientinnen  $\pm$  Standardfehler (SEM) als Fehlerbalken.

#### 4.2.2 In-vivo $\gamma$ -H2AX – Foci-Verlust als DSB-Reparaturkinetik nach WBRT

In Abb. 4.3 a ist die mittlere Anzahl an  $\gamma$ -H2AX-Foci zu den Reparaturzeitpunkten 0,5 h, 2,5 h, 5 h und 24 h dargestellt. Die Darstellung zeigt einen schnellen Anstieg der  $\gamma$ -H2AX-Foci bis 30min nach Strahlenexposition auf 0,65 F/Z und einen Foci-Verlust von 0,37 F/Z auf 0,28 F/Z nach 2,5 h und auf 0,011 F/Z nach 24 h. Die prozentuale Darstellung in der Abb. 4.3 b zeigt zu Beginn innerhalb der ersten 5 Stunden eine zügige Abnahme der residualen  $\gamma$ -H2AX-Foci um durchschnittlich 74%. In weiteren 19 Stunden findet ein langsamerer Verlust auf unter 1% des nach 30 Minuten induzierten Foci-Levels statt.

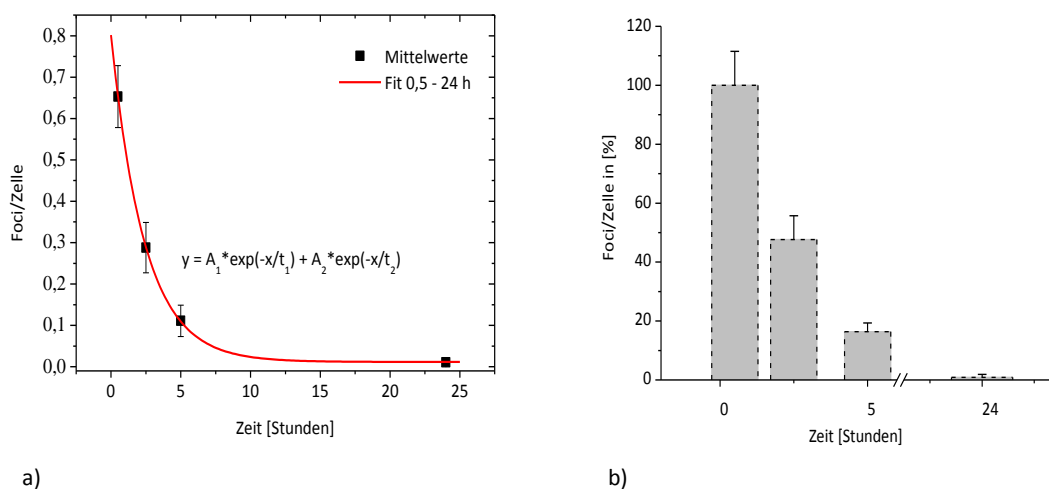
Die resultierende Verlustkinetik der  $\gamma$ -H2AX-Foci stellt eine biphasisch exponentielle Funktion mit der Formel

$$F/Z = A_1 \cdot \exp\left(-\frac{x}{t_1}\right) + A_2 \cdot \exp\left(-\frac{x}{t_2}\right), \text{ mit } t > 0,5 \text{ h}, t_1 = t_{\text{schnell}} \text{ und } t_2 = t_{\text{langsam}}$$

dar.

Die exponentielle Funktion ist charakterisiert durch zwei Reparaturphasen mit unterschiedlichen Reparaturhalbwertszeiten  $t_{1/2, \text{ schnell}}$  und  $t_{1/2, \text{ langsam}}$  für die schnelle und langsame Komponente der DSB-Reparatur (195).

In Abb. 4.3 sieht man die in-vivo Kinetik mittels  $\gamma$ -H2AX-Methode. Der zeitliche Verlauf der Foci pro Zelle wird gut durch diesen biphasisch exponentiellen Verlauf repräsentiert, wie der Fit in Abb. 4.3 a zeigt.

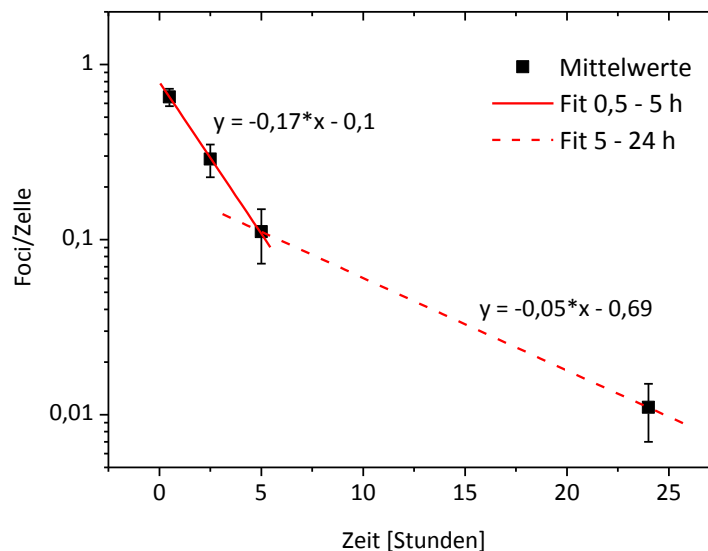


**Abb. 4.3:** In-vivo Kinetik mittels  $\gamma$ -H2AX-Methode

In-vivo DSB-Reparatur in Blutlymphozyten. Darstellung der DSB-Reparatur als Verlust an  $\gamma$ -H2AX-Foci nach 0,5, 2,5, 5 und 24 h nach WBRT mit 2 Gy - Mittelwert über alle Patientinnen.

Der Hintergrund an Foci vor der Bestrahlung (Kontrolle) wurde von der gezählten Focizahl subtrahiert (d.h. nur strahleninduzierte  $\gamma$ -H2AX-Foci sind dargestellt). Die Daten sind als Mittelwerte mit dazugehörigem Standardfehler (SEM) als Fehlerbalken aufgetragen.

Abb. 4.4 bestätigt in halblogarithmischer Darstellung den biphasisch exponentiellen Reparaturverlauf durch einen linearen Fit der logarithmierten  $\gamma$ -H2AX-Foci-Mittelwerte. Die schnelle Reparaturkomponente zu Beginn der Reparatur zwischen 0,5 h und 2,5 h ist gekennzeichnet durch eine negative Steigung von -0,17 [F/Z/h]. Die langsame Komponente zwischen 5 und 24 h post RT durch eine größere Steigung von -0,05 [F/Z/h]. Der Wert der Reparaturkonstanten ist negativ, da er angibt, um welchen Wert sich der noch vorhandene F/Z-Wert pro Zeiteinheit reduziert.



**Abb. 4.4:** In-vivo Kinetik mittels  $\gamma$ -H2AX-Methode in halblogarithmischer Darstellung.

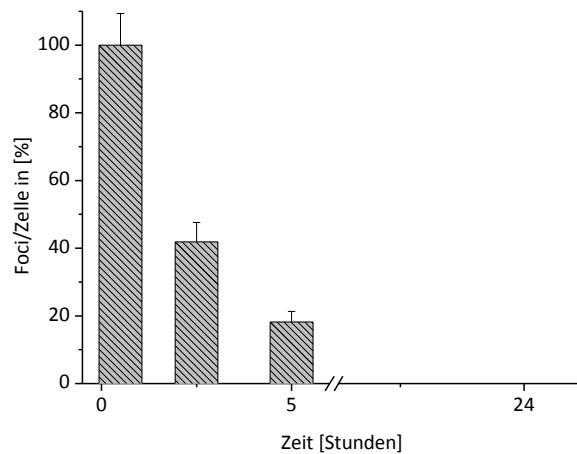
### 4.3. Vergleichende DSB-Reparaturkapazität nach in-vitro Bestrahlung

Wie im Folgenden gezeigt wird, stimmt die *in-vivo* DSB-Reparaturkinetik in Abb. 4.5 nach therapeutischer Bestrahlung der Patientinnen qualitativ mit dem Reparaturverhalten definierter *in-vitro* Bestrahlungen überein.

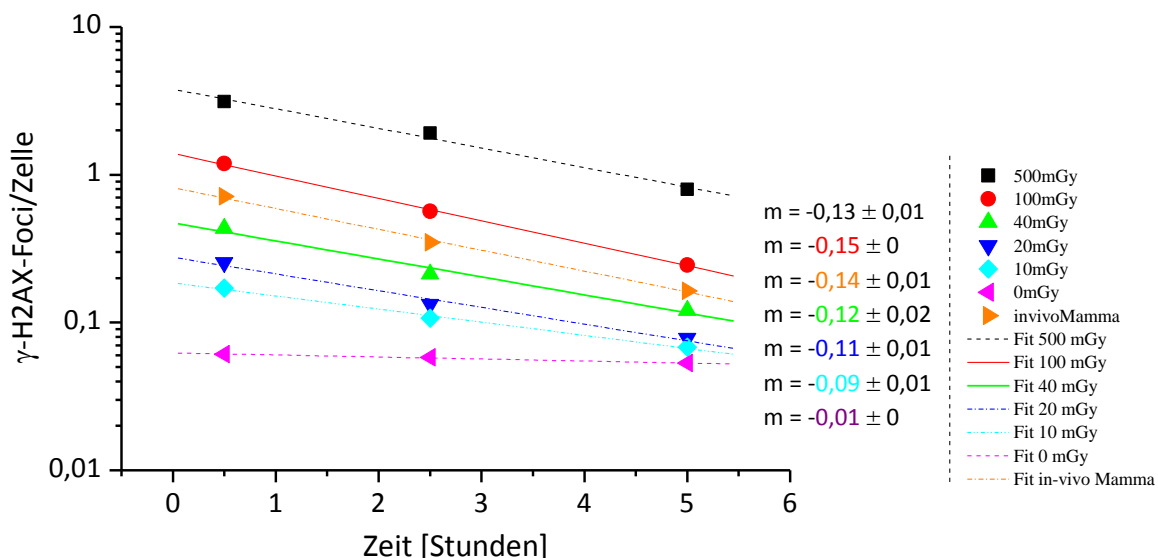
Untersuchungsergebnisse von Löbrich und Rothkamm et al. zeigten, dass mit der Erstellung einer  $\gamma$ -H2AX Foci-Kinetik induzierte Strahlenschäden *in-vitro* nach niedrigen Strahlendosen zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen werden können und diese Rückschlüsse auf den DSB-Reparaturverlauf zulässt (15,77).

In einer zweiten Versuchsreihe wurden daher Blutproben mit definierten Dosen (10, 20, 40, 100, 500 mGy) *in-vitro* bestrahlt und die Lymphozyten bezüglich entstandener  $\gamma$ -H2AX Foci zu verschiedenen Zeitpunkten (0,5, 2,5, 5h) nach Bestrahlung analysiert.

Die Mittelwerte werden in Abb. 4.6 in halblogarithmischer Darstellung gezeigt. Zum Vergleich sind in der Abb. 4.6 auch die in-vivo Daten mit aufgenommen.



**Abb. 4.5:** In-vitro DSB-Reparatur in Blutlymphozyten. Darstellung der DSB-Reparatur als Verlust an  $\gamma$ -H2AX-Foci nach 0,5 h, 2,5 h, 5 h nach Röntgenbestrahlung mit 40 mGy - Mittelwert über alle Patientinnen und Normierung auf die Induktion nach 30 min..



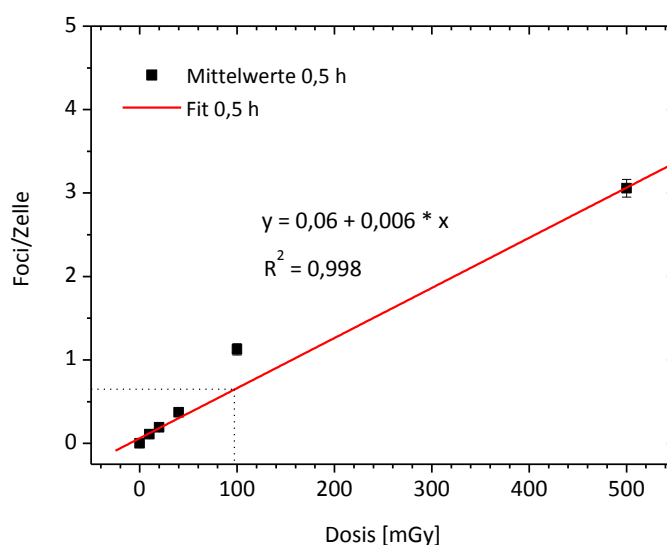
**Abb. 4.6:** In-vivo DSB-Reparatur im Vergleich zur in-vitro DSB-Reparatur in humanen Blutlymphozyten. Für die in-vitro Kinetiken wurden Blutproben entnommen und mit 10, 20, 40, 100 und 500 mGy bestrahlt und zur Reparatur über eine Zeit von 0,5, 2,5 oder 5 h inkubiert. Danach wurden die Lymphozyten isoliert und hinsichtlich ihrer  $\gamma$ -H2AX Foci analysiert. Der Hintergrund-Level (Kontrolle) nicht bestrahlter Lymphozyten war über 5 Stunden nach Bestrahlung (zwischen 0,05 bis 0,06 F/Z) konstant. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert von 17 unabhängigen Untersuchungen und die Fehlerbalken den Standardfehler dar.

Sowohl die in-vivo als auch die in-vitro Daten zeigen in der halblogarithmischen Darstellung einen linearen Verlauf, der die exponentielle Reparaturkinetik repräsentiert. Nach in-vitro Bestrahlung mit einer hohen Dosis von beispielsweise 500 mGy zeigt sich über die Zeit eine exponentielle Abnahme der  $\gamma$ -H2AX Foci von einem Maximum von  $3,12 \pm 0,106$  F/Z nach 30 min auf einen Wert von  $0,79 \pm 0,057$  nach 5 h.

Auch im Niedrigdosisbereich wie beispielsweise bei 40 mGy in Abb. 4.5 zeigt sich eine exponentielle Abnahme der Foci über die Zeit. Auffällig in Abb. 4.6 ist die nur geringe Variation der Steigung bei hohen Expositionsdosen (40 bis 500 mGy), was auf eine dosisunabhängige Reparaturkinetik in diesem Dosisbereich hindeutet. Die linearen Fits unterscheiden sich im Wesentlichen von der dosisabhängigen Foci-Induktionshöhe pro Zelle als Y-Achsenabschnitt. Für niedrige Bestrahlungsdosen von 10 mGy zeigt sich jedoch eine größere Abweichung, was auf ein unterschiedliches Reparaturausmaß für sehr niedrige Bestrahlungsdosen hinweisen könnte. Dabei bleibt ungeklärt, ob der zeitliche Foci-Verlauf der 10 mGy-Exposition aufgrund der geringen Abweichung zum natürlichen Foci-Hintergrund-Level und dem damit am ehesten nicht ausreichendem Signal-zu-Rauschverhältnis, direkt mit den übrigen Bestrahlungsdosen ins Verhältnis gesetzt werden kann.

Betrachtet man die Reparaturkinetik aus der in-vivo-WBRT in Abb. 4.6, so bewegt sich die induzierte  $\gamma$ -H2AX Focizahl zwischen der 40 und 100 mGy dosisäquivalenten Probe. Die  $\gamma$ -H2AX-Induktion steigt monoton mit der Strahlendosis von 10 bis 500 mGy an.

In Abb. 4.7 ist die induzierte Foci-Zahl pro Zelle gegen die Strahlendosis aufgetragen. Man erkennt einen linearen Zusammenhang zwischen der Dosis und entstandener F/Z. Für den linearen Fit wurde der Wert bei 100 mGy nicht berücksichtigt, da er vom erwartenden linearen Verlauf deutlich abweicht. Wodurch diese Abweichung hervorgerufen wird, ist derzeit noch unklar.



**Abb. 4.7:** Dargestellt ist die Anzahl der  $\gamma$ -H2AX Foci abhängig von der Induktionsdosis, bestimmt zum Zeitpunkt 30 Minuten nach Strahlenexposition. 2-fach logarithmische Auftragung der Mittelwerte, Standardfehler als Fehlerbalken.

Dieser lineare Zusammenhang kann genutzt werden, um eine Eichkurve zur dosimetrischen Messung strahlenexponierter Individuen zu erstellen und damit die Dosisbelastung des Blutes zu bestimmen. In Abb. 4.7 entspricht eine Foci-Induktion von 0,6 F/Z nach WBRT mit 2 Gy einer Dosisbelastung des Blutes von etwa 90 mGy. Analog dieser Auswertung kann bei einer homogenen in-vitro Bestrahlung einer Blutprobe bei definierter Strahlendosis die zu erwartende induzierte Focizahl über die lineare Funktion abgelesen werden.

#### **4.4. Streuung und Verteilung von $\gamma$ -H2AX-Foci - Implikation für die Teilkörperbestrahlung und Dosimetrie**

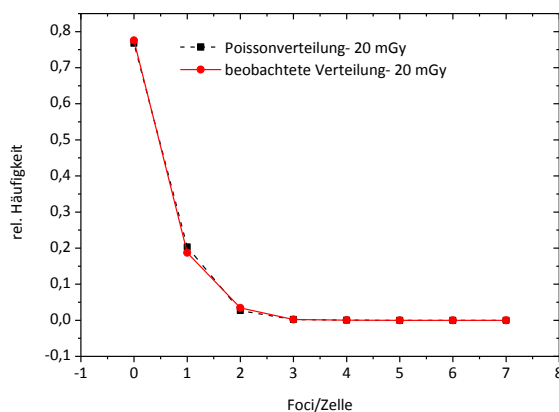
Die gezählten  $\gamma$ -H2AX-Foci des Datenpunkts 0,5 h, initiale Foci-Induktion nach der ersten Fraktion der WBRT mit 2 Gy, wurden in Tab. 4.4 aufgeführt. Über alle 17 Patientinnen konnten in 1459 von insgesamt 2114 gezählten Lymphozyten keine  $\gamma$ -H2AX-Foci nachgewiesen werden. Neben der beobachteten Verteilung konnte eine statistische Poissonverteilung der  $\gamma$ -H2AX-Foci berechnet werden. Diese Focus-Verteilung zeigt in der Tab. 4.4 eine signifikante Abweichung von der Poissonverteilung. In der Abb. 4.8 a und b wurde die relative Häufigkeit des Auftretens von Foci in den Zellen für die beobachtete Foci-Verteilung und die Poissonverteilung aufgetragen. In der Darstellung wird deutlich, dass die gezählte Fociverteilung in den Zellen unserer in-vivo Versuchsreihe signifikant von der statistischen Poissonverteilung abweicht. Diese Abweichung bei der in-vivo Bestrahlung der Mamma wurde durch den Dispersions-Index Test (196) bestätigt und resultiert in einem Dispersionsindex höher als 2,0. Ein mittlerer Dispersionsindex größer als 2 und ein U-Wert größer als 3,891 bestätigen eine signifikante, nicht zufällige Verteilung von  $\gamma$ -H2AX-Foci im Signifikanzniveau von 5% und 0,01% ( $p < 0,0001$ ) und somit eine Abweichung von der statistischen Poissonverteilung (77,197,198). Der mittlere Dispersionsindex betrug in diesem Fall  $2,09 \pm 0,031$  und der U-Wert (Standardabweichung) war 35,6.



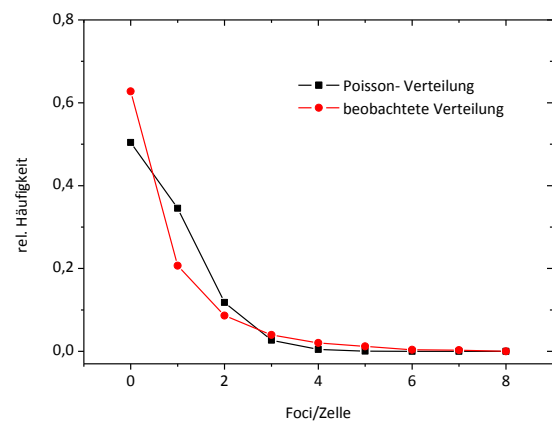
**Tab. 4.4:**  $\gamma$ -H2AX Foci-Verteilung 30 Minuten nach der 1. Bestrahlungsfraction mit 2 Gy

30 min nach RT –		
Anzahl der Zellen		
$\gamma$ -H2AX-Profil	Beobachtete Verteilung*	Poisson-Verteilung
Null F/Z	1459	1066
Ein F/Z	363	730
Zwei F/Z	152	250
Drei F/Z	66	57
Vier F/Z	36	10
Fünf F/Z	29	1
Sechs F/Z	6	0
Sieben F/Z	3	0
Acht und mehr F/Z	0	0

\* Die Anzahl der gezählten Lymphozyten ist beispielhaft für den Datenpunkt 0,5 h nach der ersten Bestrahlungsfraction der WBRT mit 2114 gezählten Zellen aller 17 Patientinnen dargestellt. Die Werte zeigen die Anzahl der gezählten Lymphozyten mit definierter Zahl an  $\gamma$ -H2AX-F/Z.



a)



b)

**Abb. 4.8:**  $\gamma$ -H2AX-Foci-Verteilungsanalyse; Vergleich mit der Poissonverteilung

Die beobachtete Verteilung in b) weicht signifikant von einer Poissonverteilung ab. Dies spricht für eine Teilkörperbestrahlung. Der mittlere Dispersionsindex war  $2,09 \pm 0,031$  (SEM), der U-Wert (Standardabweichung) war  $35,6$ .

In a) ist zum Vergleich die Focusverteilung nach in-vitro RT mit beispielsweise 20 mGy dargestellt.

**Tab. 4.5:**  $\gamma$ -H2AX-Focus-Verteilung nach Strahlenexposition in-vivo und in-vitro

$\gamma$ -H2AX	RT†		10 mGy in-vitro‡		20 mGy in-vitro°		100 mGy in-vitro §	
	Beob. Verteilung*	Poisson Verteilung	Beob. Verteilung*	Poisson Verteilung	Beob. Verteilung*	Poisson Verteilung	Beob. Verteilung*	Poisson Verteilung
Null F/Z	1459	1066	3915	3842	2252	2168	243	225
Ein F/Z	363	730	585	661	478	574	244	274
Zwei F/Z	152	250	60	57	87	76	165	167
Drei F/Z	66	57	3	3	6	7	88	68
Vier F/Z	36	10	0	0	2	0	18	21
Fünf F/Z	29	1	0	0	0	0	2	5
Sechs F/Z	6	0	0	0	0	0	0	1
Sieben F/Z	3	0	0	0	0	0	0	0
≥ Acht F/Z	0	0	0	0	0	0	0	0

\* Die Anzahl der gezählten Lymphozyten ist für den Datenpunkt 30 Minuten nach der ersten Bestrahlungsfraction und der in-vitro Daten von 10,20 und 100 mGy dargestellt. Die Werte zeigen die gezählte Lymphozytenzahl mit definierter Anzahl an  $\gamma$ -H2AX-F/Z.

† 2114 Zellen in 17 Patientinnen wurden mit 2 Gy (Bestrahlungsfraction der Mamma) bestrahlt. Der mittlere Dispersionsindex war **2,09**  $\pm$  0,031 (Standardabweichung der Mittelwerte)), der U-Wert (Standardabweichung) war **35,6** und die mittlere Fraktion an bestrahlten Lymphozyten war **0,45**.

‡ 4563 Zellen in 17 Patienten wurden in-vitro mit 10 mGy bestrahlt. Der mittlere Dispersionsindex war **1,04**  $\pm$  0,021, der U-Wert war **3,97** und die mittlere Fraktion an bestrahlten Lymphozyten war **0,97**.

° 2825 Zellen in 17 Patienten wurden in-vitro mit 20 mGy bestrahlt. Der mittlere Dispersionsindex war **1,11**  $\pm$  0,027, der U-Wert war **1,77** und die mittlere Fraktion an bestrahlten Lymphozyten war **0,95**.

§ 760 Zellen in 17 Patienten wurden mit 100 mGy bestrahlt. Der mittlere Dispersionsindex war **1,0** ( $\pm$  0,051), der U-Wert war **0,032** und die mittlere Fraktion an bestrahlten Lymphozyten war **0,91**.

Im Gegensatz zu den in-vivo Daten unserer Patientinnen zeigt die Focus-Verteilung nach in-vitro Bestrahlung eine gute Korrelation mit der Poissonverteilung, siehe Tab. 4.5 und Abb. 4.8 a). Für die 20 und 100 mGy-Blutproben konnte beispielsweise ein Dispersionsindex kleiner als 2 und ein U-Wert von 1,77 und 0,032 respektiv berechnet werden. Damit korreliert die Focus-Verteilung der 20 mGy (auch der 100 mGy) in-vitro Proben (Abb. 4.8 a) analog publizierter Daten von Rothkamm et al. mit der Poissonverteilung im Sinne einer homogenen Dosisbelastung des Blutes (77). Die 10 mGy-Probe ergab dagegen einen grenzwertig erhöhten U-Wert von 3,97 mit einen Dispersionsindex von 1,04 ( $\pm$  0,021). Bei sehr niedrigen Strahlendosen ist durch die hohe Anzahl an nicht exponierten und nicht geschädigten Zellen eine statistische Poissonverteilung wenig aussagekräftig.

### ***Berechnung der Bestrahlungsfraction von Blutlymphozyten mit der $\gamma$ -H2AX-Methode***

Zur Berechnung der mittleren Fraktion des strahlenexponierten Blutanteils wurde die kontaminierte Poissonmethode verwendet (92,199). Dabei wird angenommen, dass die gemessene Verteilung an  $\gamma$ -H2AX-Foci in den Blutlymphozyten aus der Kombination von zwei Poisson-Verteilungen besteht. Diese repräsentieren zum einen die bestrahlten relativen Zellanteile, in denen ein oder mehrere, sowie null Foci vorhanden sind. Zum anderen beinhalten sie auch die unbestrahlte Fraktion des Blutes mit null Foci (77). Bei sehr niedrigen Bestrahlungsdosen für 10 und 20 mGy überwiegt der Anteil der bestrahlten Fraktion mit null Foci. Die berechnete Fraktion in Tab. 4.5 strahlenexponierter Blutlymphozyten nach WBRT war mit 45% im Vergleich zur wohldefinierten in-vitro Bestrahlung signifikant kleiner als 100 %. Dies verdeutlicht, dass es sich bei der Bestrahlung des Brustdrüsengewebes durch zirkulierende Blutlymphozyten nicht um eine homogene Bestrahlung des Blutes, sondern um eine Teilblut- oder Teilkörperbestrahlung handelt. Tab. 4.5 zeigt, dass die mittlere Bestrahlungsfraction der in-vitro Daten (10, 20, 100 mGy) minimal um 3% bis maximal 9 % von 100% abweicht.

### ***Dosimetrische Messung der Teilkörperdosis mittels der $\gamma$ -H2AX-Methode***

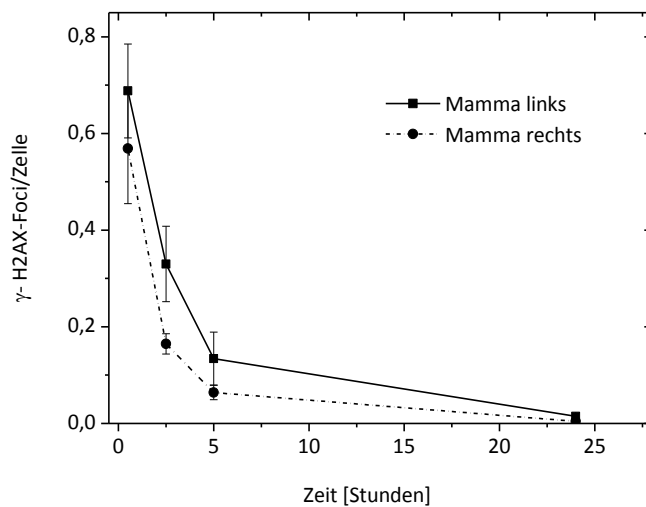
Nach Anwendung der kontaminierten Poisson-Verteilung und Erstellung der in Abb. 4.7 dargestellten in-vitro Eichkurven für wohldefinierte Strahlendosen von 10 bis 500 mGy lässt sich dosimetrisch die Dosis der bestrahlten Blutlymphozytenanteile während der therapeutischen WBRT bestimmen.

Nach der kontaminierten Poisson-Methode ergibt eine mittlere Focizahl bestrahlter Lymphozyten von 1,19 F/Z, welche der 106 mGy dosisäquivalenten Probe der in-vitro Messung entspricht. Die dargestellten Messpunkte in Abb. 4.7 zeigen jedoch, dass abhängig von den berücksichtigten in-vitro Dosispunkten unterschiedliche Kalibrierungskurven mit deutlicher Abweichung der geschätzten Teilkörperdosis von 10-20% bis zu max. 99% resultieren können.

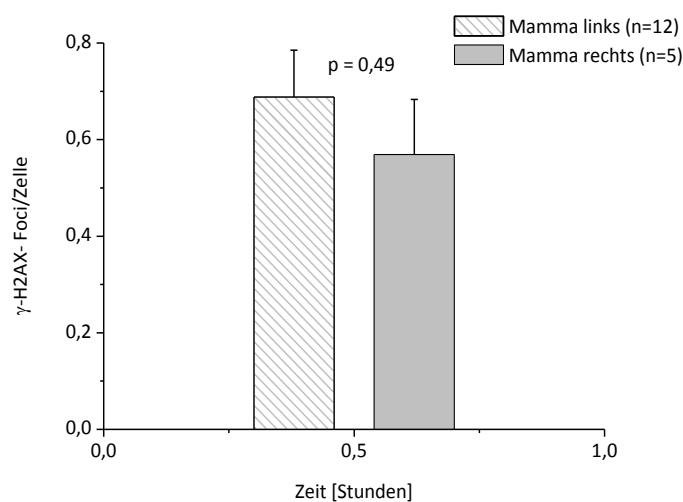
Aus der abgeschätzten Dosis mit einem bestrahlten Anteil der zirkulierenden Blutlymphozyten von 45 % (0,45) können bei einer Einzeldosis von 2 Gy pro Fraktion Rückschlüsse auf die Aufenthaltszeit zirkulierender Lymphozyten im Bestrahlungsfeld gezogen werden. Retrospektiv ergab sich daraus für unser Patientinnenkollektiv, dass die Lymphozyten für einen Bruchteil von 1/19 der Bestrahlungszeit strahlenexponiert waren.

### Vergleich der $\gamma$ -H2AX-Induktion abhängig von der bestrahlten Brustseite

Unter der Annahme der erhöhten Induktion an  $\gamma$ -H2AX-Foci unter Bestrahlung größerer Blutanteile der linken Thoraxhälfte mit Herz, oberer Hohlvene und Aorta wurden die Patientinnen nach dem primären Tumorsitz in zwei Behandlungsgruppen „rechte“ und „linke“ Mamma aufgeteilt. Zur quantitativen Beurteilung der  $\gamma$ -H2AX-Induktion innerhalb des heterogenen Kollektivs wurden sie in Abb. 4.9 und Abb. 4.10 getrennt voneinander gemäß ihrer Reparaturkinetik und der Induktion nach 30 min betrachtet.



**Abb. 4.9:** Darstellung der DSB-Reparaturkinetik von Patientinnen mit Bestrahlung der rechten Brust (Punkte) und der linken Brust (geschlossene Quadrate). Angegeben sind die Mittelwerte der  $\gamma$ -H2AX-Foci über 24 Stunden.



**Abb. 4.10:**  $\gamma$ -H2AX-Foci-Induktion nach 30 min für die rechte und linke Mammagruppe.

Man erkennt in Abb. 4.9 eine vergleichbare exponentielle zeitliche Abnahme der  $\gamma$ -H2AX-Foci mit erhöhter Induktion in der Gruppe mit Bestrahlung der linken Brust. Dieser Trend zeigt die Abhängigkeit der DSB-Induktion von der Durchblutung und damit verbundenen Durchfluss an Blutlymphozyten im Bestrahlungsfeld. Die Abb. 4.10 zeigt, dass die Foci-Induktion nach 30 min bei den Patientinnen mit linkseitiger Brustbestrahlung höher ist als bei der Gruppe mit rechtsseitiger Brustbestrahlung. Im statistischen Test zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied betreffend der Höhe der Foci-Induktion und der bestrahlten Brustseite (0,69 F/Z vs. 0,57 F/Z,  $p = 0,49$ ).

Nach Anwendung der oben vorgestellten kontaminierten Poissonverteilung auf die beiden Behandlungsgruppen erhält man für die rechte Mamma bei einer mittleren Focizahl von 1,0 F/Z eine exponierte Teilkörperdosis von 89 mGy. Die mittlere Bestrahlungsfraction der Blutlymphozyten betrug 47%. Die Lymphozyten waren demnach für einen Bruchteil von  $1/22$  der Bestrahlungszeit im Bestrahlungsfeld der rechten Mamma. Für die Behandlungsgruppe der linken Brust ergab sich eine höhere mittlere Focizahl von 1,1 F/Z mit resultierender Strahlendosis von 98 mGy. Die mittlere Fraction der bestrahlten Blutlymphozyten war im Vergleich zur rechten Mamma höher und lag bei etwa 52%. Die Lymphozyten waren etwa  $1/20$  Bruchteil der Bestrahlungszeit im linken Mammafeld.

#### **4.5. Einfluss des Bestrahlungsvolumens auf die Induktion von $\gamma$ -H2AX-Foci und Vergleich der normierten DSB-Reparatur**

Das heterogene Patientenkollektiv war retrospektiv durch individuelle Brust- und Körpervolumen mit resultierender unterschiedlicher Gewebedurchblutung im Bestrahlungsfeld gekennzeichnet. Zur Detektion strahlenempfindlicher Patientinnen, Validierung und quantitativem Vergleich induzierter  $\gamma$ -H2AX-Foci wurde eine Normierung auf das Volumen der umschließenden 50%- und 80%-Isodose durchgeführt. Zum Vergleich der  $\gamma$ -H2AX-Reparaturkinetiken wurde von den Originaldaten der natürliche Hintergrund (Kontrolle) subtrahiert und die Daten auf ein einheitliches Bestrahlungsvolumen von  $1000 \text{ cm}^3$  normiert. Das mittlere Volumen der umschließenden 80%- bzw. 50%-Isodose betrug  $1150 \text{ cm}^3 \pm 141 \text{ cm}^3$  und  $1740 \text{ cm}^3 \pm 175 \text{ cm}^3$ , dargestellt in Tab. 4.6.

Der Range für die 80%- und 50%-Isodose lag bei 231 bis  $2421 \text{ cm}^3$  und 674 bis  $3256 \text{ cm}^3$ . Das mittlere Planungszielvolumen (PTV) betrug  $1256 \text{ cm}^3 \pm 130 \text{ cm}^3$ . Das Volumen des PTVs zeigte im Seitenvergleich beider Mammæ keine wesentlichen Unterschiede ( $1398 \pm 360 \text{ cm}^3$  und  $1305 \pm 114 \text{ cm}^3$ ).

Die Gruppe der Patientinnen mit klinisch erhöhten Nebenwirkungen an der Haut (RTOG  $\geq 3$ ) zeigte im Vergleich zur Gruppe mit einer Nebenwirkungsrate von RTOG  $\leq 2$  im Mittel ein größeres Bestrahlungsvolumen, resultierend in einem größeren PTV mit größeren Anteilen dosisbelasteter Brustvolumina (V(50%) und V(80%)) (Summenscore  $\geq 3$  vs. Summenscore  $\leq 2$ , V(PTV):  $1501 \pm 138 \text{ cm}^3$  vs.  $1123 \pm 129 \text{ cm}^3$ ,  $p = 0,119$ ; V (50%):  $1921 \pm 282 \text{ cm}^3$  vs.  $1536 \pm 187 \text{ cm}^3$ ,  $p = 0,275$ ).

**Tab. 4.6:** Bestrahlungsvolumina

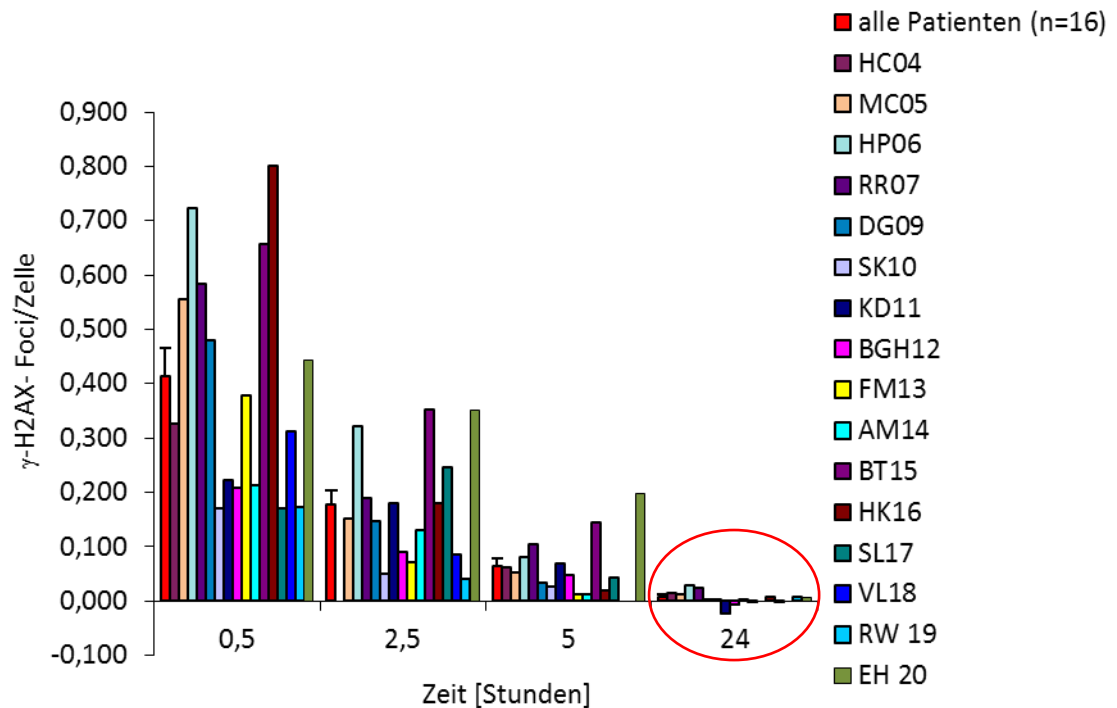
	Bestrahlungsvolumen in $\text{cm}^3$		
	V(PTV)*	V(80%)†	V(50%)†
Alle Patientinnen (n =17)	1256 ( $\pm 130$ )	1150 ( $\pm 141$ )	1740 ( $\pm 175$ )
Rechte Mamma (n =5)	1398 ( $\pm 360$ )	1283 ( $\pm 283$ )	1886 ( $\pm 421$ )
Linke Mamma (n =12)	1305 ( $\pm 114$ )	1096 ( $\pm 168$ )	1679 ( $\pm 186$ )
RTOG-Score $\leq 2$	1123 ( $\pm 129$ )	914 ( $\pm 148$ )	1536 ( $\pm 187$ )
RTOG-Score $\geq 3$	1501 ( $\pm 138$ )	1362 ( $\pm 217$ )	1921 ( $\pm 282$ )

\* angegeben ist das mittlere Volumen des Planungszielvolumens (PTV) in  $\text{cm}^3$  mit Standardfehler

† angegebenes Volumen der 80%-und 50%-Isodose

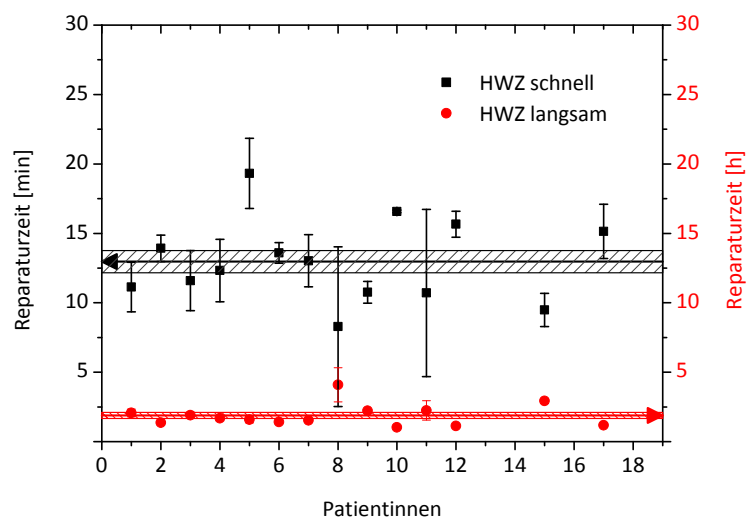
Nach Normierung auf das einheitliche Bestrahlungsvolumen von  $1000 \text{ cm}^3$  in Abb. 4.11 konnte keine Patientin mit erhöhter Strahlenempfindlichkeit durch residuale  $\gamma$ -H2AX-Foci nach 24 h identifiziert werden. Man erkennt zum Zeitpunkt 24 Stunden, dass alle Patientinnen die induzierten Foci nach 30 min auf das Hintergrundniveau reparieren und keine erhöhten residualen DSBs verbleiben.

Abb. 4.11 zeigt auch nach Normierung auf das bestrahlte Volumen von  $1000 \text{ cm}^3$  im Reparaturverlauf von 24 Stunden Schwankungen zwischen den Patientinnen, die auf ein interindividuell unterschiedliches Reparaturverhalten der Patientinnen zurückzuführen sind.



**Abb. 4.11:** Individuelle Kinetik des  $\gamma$ -H2AX-Foci-Verlust in peripheren Blutlymphozyten bei Patientinnen mit Mammakarzinom nach der WBRT mit 2 Gy über 24h. Die Daten sind dargestellt nach Subtraktion des Hintergrunds (Kontrolle) und Normierung auf ein einheitliches bestrahltes Volumen von 1000 cm<sup>3</sup>.

In Abb. 4.12 sind die Reparaturhalbwertszeiten der schnellen und langsamen DSB-Reparatur der einzelnen Patientinnen dargestellt. Diese zeigen ebenfalls systematische Schwankungen, die eine interindividuelle Reparaturkinetik dieses Patientinnenkollektivs bekräftigen.



**Abb. 4.12:** Reparaturhalbwertszeiten für die schnelle und langsame Komponente der DSB Reparatur. Die Geraden stellen die Mittelwerte für die schnelle Komponente im Minutenbereich (**schwarz**) und die langsame Komponente im Stundenbereich (**rot**) dar.

#### **4.6. Radiogene Dermatitis nach WBRT**

Die akuten Nebenwirkungen der Haut während der Strahlentherapie stellen einen guten Indikator für die klinische Radiosensitivität von Brustkrebspatientinnen dar (200).

Die Verteilung der radiogen induzierten akuten Hautreaktion (Dermatitis) als modifizierter Summenscore der RTOG (189) für die Aspekte Erythem und Desquamation (Grad 1-4) ist in Tab. 4.7 dargestellt.

Zu Beginn der Strahlentherapie war der mediane Summenscore für die Aspekte Erythem und Desquamation bei allen Patientinnen 0.

Nach einer mittleren Bestrahlungsdosis von  $60 \pm 3$  Gy lag bei 52,9 % (n=9) der Patientinnen ein Summenwert größer als 3 vor. Neun von 17 Patientinnen hatten einen Summenwert  $\geq 3$ , nur eine Patientin zeigte einen Summenwert von 5. Nach 30 Gy in der 3. Woche ergab sich für alle Patientinnen ein medianer Summenscore von  $\leq 1$  (Range 0 - 4 Punkte). Bei vier Patientinnen zeigte sich ein leichtes Erythem, sowie Desquamation und bei einer Patientin ein mäßiges Erythem mit beginnenden Epitheliolysen Grad 2 und trockener Desquamation. Nach Abschluss der WBRT in der 5. Woche ergab sich über alle Patientinnen einen mittleren Summenscore von 1,8 mit einem Range von 0 bis 4 Punktwerte. Als maximale Ausprägung der Aspekte Erythem und Desquamation zeigten sich bei 2 Patientinnen (11,7%) ein strahlenbedingtes Erythem dritten Grades und bei fünf Patientinnen (29,4%) eine Desquamation zweiten Grades. Keine Patientin hatte eine Desquamation  $\geq 3$ . Bei beiden Patientinnen mit Dermatitis Grad  $\geq 3$  war die verordnete Dosis nicht signifikant unterschiedlich zu Patientinnen mit einer Dermatitis Grad  $\leq 3$ . Die mittlere verabreichte Dosis aller Patientinnen lag bei  $60 \pm 3$  Gy. Die mittlere Zeit zur Ausprägung eines Erythems oder einer Desquamation Grad  $\geq 2$  lag respektiv bei 3,5 und 4,4 Wochen.

Als maximale Ausprägung fanden sich bei einer mittleren Dosis von  $60 \pm 3$  Gy ein Grad 3-Erythem mit Rötung und konfluierenden Epitheliolysen in 2 Patientinnen (11,7%) und eine trockene Desquamation Grad 2 in 5 Patientinnen (29,4%).



**Tab. 4.7:** Inzidenz an radiogener Dermatitis\****Inzidenz von Toxizität - Erythem/Desquamation***

		RTOG-Summen-Score - Zahl der Patientinnen				
		Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4	Grad 5
Alle Patientinnen (n=17)		2	6	4	4	1

***Inzidenz von Toxizität - Erythem***

		RTOG-Einzel-Score - Zahl der Patientinnen				
		Grad 0	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4
Alle Patientinnen (n=17)		-	9	6	2	-

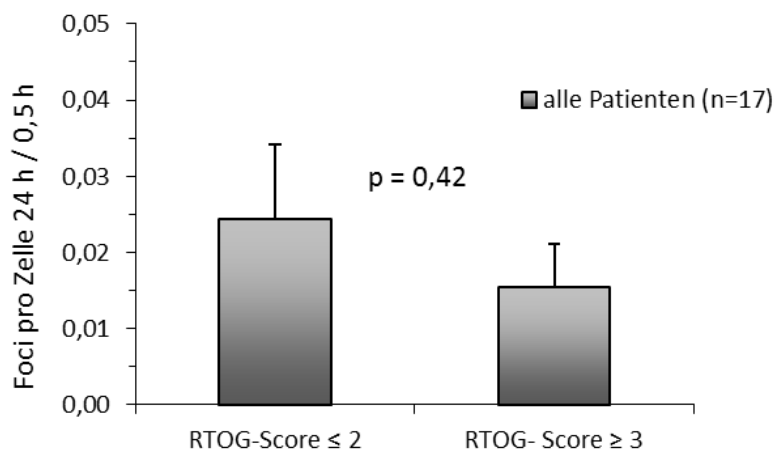
***Inzidenz von Toxizität - Desquamation***

		RTOG-Einzel-Score - Zahl der Patientinnen				
		Grad 0	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4
Alle Patientinnen (n=17)		1	10	5	-	-

\* Inzidenz an radiogen induzierter akuter Hautreaktion (Dermatitis) hinsichtlich der Aspekte Erythem und Desquamation im Rahmen der therapeutischen Bestrahlung der Brust klassifiziert nach dem modifizierten Score der RTOG (Radiotherapy Oncology Group)(189). Angegeben sind die Inzidenz für die einzelnen Punktwerte für Erythem und Desquamation, sowie deren Summenwert als Summenscore.

#### 4.7. Assoziation von DSB-Reparatur und radiogener Dermatitis

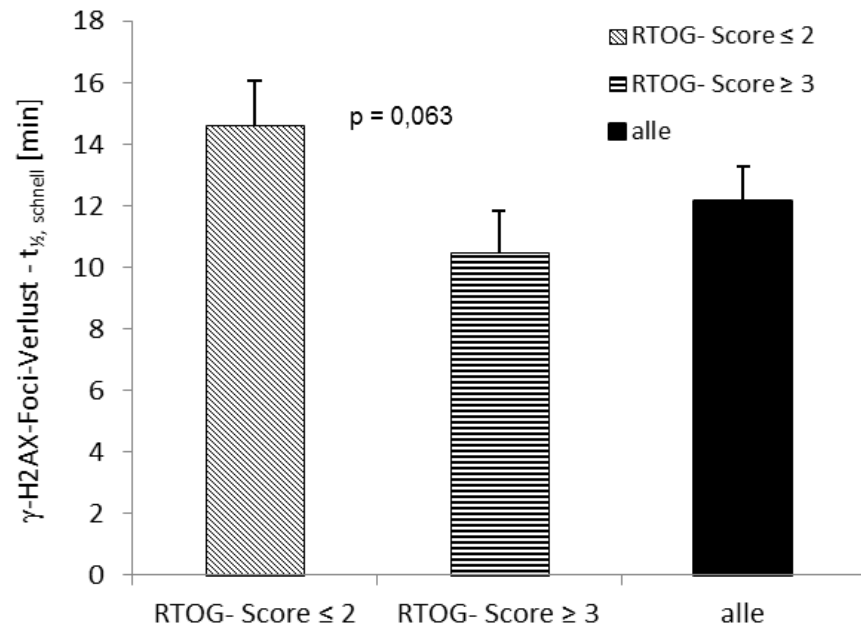
Vergleicht man in Abb. 4.13 die Gruppe an Patientinnen mit einem Summengrad  $\leq 2$  mit denen die einen Summengrad  $\geq 3$  entwickelten, so war die  $\gamma$ -H2AX-Foci- oder DSB-Reparatur nicht signifikant verschieden (RQ total  $\frac{24 \text{ h}}{0,5 \text{ h}}$  :  $0,024 \pm 0,010$  vs.  $0,015 \pm 0,006$ ,  $p = 0,42$ ). Man erkennt in Abb. 4.13 eine erhöhte Reparaturquote bei den Patientinnen mit vermehrten Nebenwirkungen.



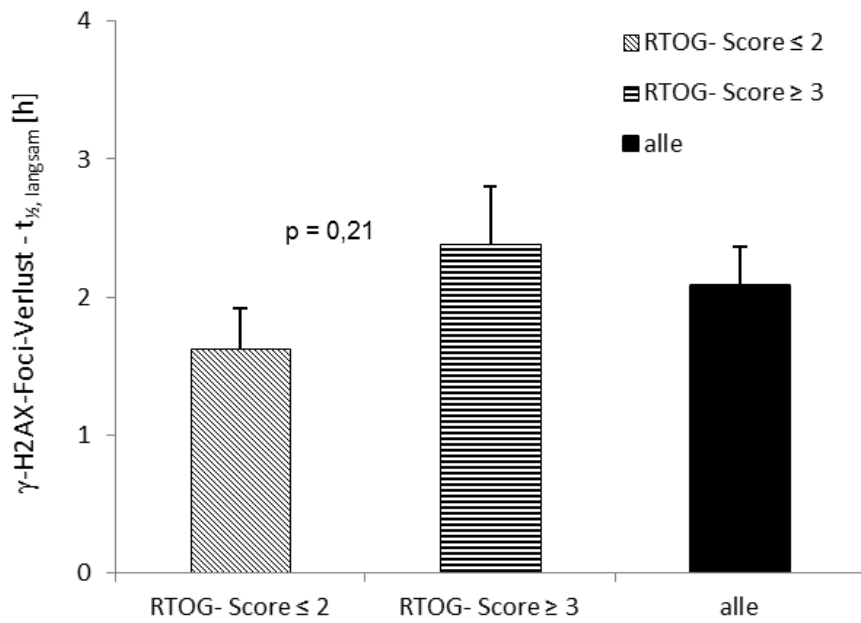
**Abb. 4.13:** Die statistische Analyse zeigte keine signifikanten Unterschiede für Patientinnen stratifiziert nach leichter und moderat bis schwerer Dermatitis nach alleiniger Radiotherapie der Brust in Bezug auf residuale  $\gamma$ -H2AX-Foci nach 24 Stunden im Verhältnis zur  $\gamma$ -H2AX-Foci-Induktion nach 30 Minuten (RQ total  $\frac{24 \text{ h}}{0,5 \text{ h}}$ ) nach WBRT mit 2 Gy.

Bei drei Patienten war der RQ total  $\frac{24 \text{ h}}{0,5 \text{ h}}$  höher als 0,039 (d.h. mehr als 1 Standardabweichung vom Mittelwert, repräsentativ als Indikator für eine verminderte DSB-Reparatur). Von diesen zeigten zwei Patientinnen (66,6 %) eine Dermatitis Grad  $\geq 3$  und eine Patientin (33,3 %) eine Dermatitis Grad  $\leq 2$ .

Die Analyse der Halbwertszeiten des  $\gamma$ -H2AX-Foci-Verlusts in den Blutlymphozyten zeigt für die schnelle und langsame Reparaturkomponente im Mittel über alle Patientinnen eine Halbwertszeit von  $12,15 \pm 1,1$  min und  $2,08 \pm 0,29$  h (siehe Abb. 4.14 und Abb. 4.15). Betrachtet man Patientinnen der beiden Gruppen (RTOG-Score  $\leq 2$  vs. RTOG-Score  $\geq 3$ ) getrennt, so erkennt man keinen Unterschied in der Reparaturkinetik ( $t_{1/2, \text{ schnell}}$  :  $14,63 \pm 1,45$  min vs.  $10,5 \pm 1,35$  min,  $p = 0,063$ ;  $t_{1/2, \text{ langsam}}$  :  $1,63 \pm 0,29$  h vs.  $2,39 \pm 0,42$  h,  $p = 0,21$ ). Aufgrund der geringen Fallzahl kann über die statistische Signifikanz des Unterschiedes allerdings nur bedingt eine Aussage getroffen werden.

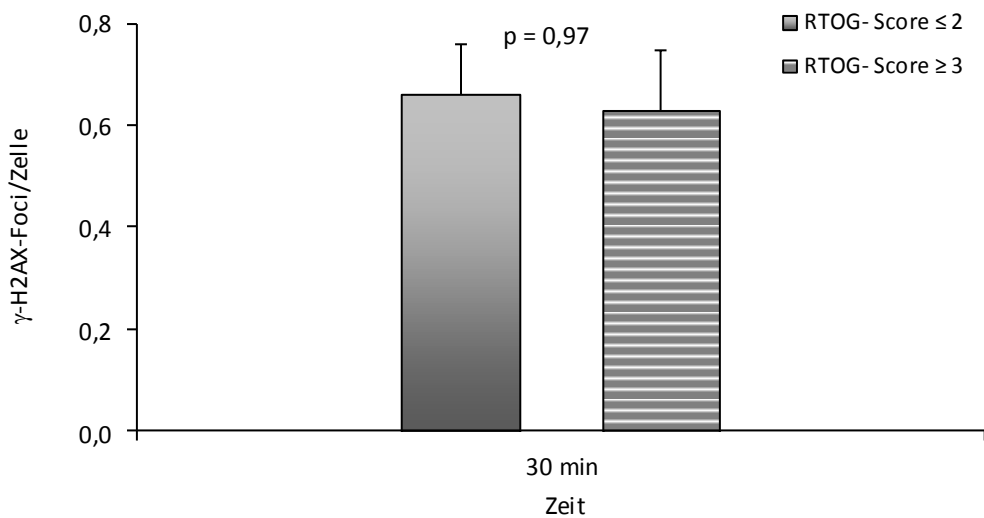


**Abb. 4.14:** Analyse der Reparaturhalbwertszeiten für die schnelle Komponente ( $t_{1/2, \text{ schnell}}$ ) in Minuten.



**Abb. 4.15:** Analyse der Reparaturhalbwertszeiten für die langsame Komponente ( $t_{1/2, \text{ langsam}}$ ) in Stunden.

Die Foci-Induktion 30 min nach Bestrahlung in Abb. 4.16, zeigte in der Gruppe der Patientinnen mit Grad  $\leq 2$  Dermatitis im Vergleich zur Grad  $\geq 3$  Dermatitis ( $0,66 \pm 0,096$  F/Z vs.  $0,63 \pm 0,12$ ,  $p = 0,97$ ), repräsentativ für eine höhere Anzahl an DSBs, keinen signifikanten Unterschied. Das behandelte Volumen der 50%-Isodose (D50%) war in der Gruppe der Patientinnen mit Summengrad  $\leq 2$  etwas kleiner als in der Gruppe der Dermatitis dritten Grades ohne signifikanten statistischen Unterschied ( $1536 \pm 187$  cm<sup>3</sup> vs.  $1921 \pm 282$  cm<sup>3</sup>,  $p = 0,28$ ). Die Gruppe der Patientinnen mit niedriger Toxizität umfasste einen erhöhten Anteil mit linksseitiger Brustbestrahlung (87% vs. 55%). Eine erhöhte Induktion an Foci bei Bestrahlung größerer Blutanteile konnte im Rahmen der Fehler nicht gezeigt werden.



**Abb. 4.16:** Absolute  $\gamma$ -H2AX-Foci-Induktion gemessen nach 30 min - Vergleich der beiden Nebenwirkungsgruppen leichte bis moderate und schwere Toxizität.

## 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Etablierung und Evaluation der  $\gamma$ -H2AX-Methode als prädiktiver Test im klinischen Kontext zur Beurteilung der individuellen Radiosensitivität und dem Ausmaß radiogen induzierter Akutnebenwirkungen der Haut nach konventioneller WBRT untersucht. Gemessen wurden die induzierten DSBs in Blutlymphozyten *in-vivo* und *in-vitro*, repräsentativ als  $\gamma$ -H2AX-Foci, nach der ersten Bestrahlungsfraction mit 2 Gy mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie. Die Arbeit orientiert sich im Wesentlichen an experimentellen Vorstudien mit menschlichen und tierischen Zellen der Arbeitsgruppen von Rübe C.E. und Löbrich et al. im Rahmen einer Low-Dose Strahlenexposition.

Die Anwendung der  $\gamma$ -H2AX-Methode war in Blutlymphozyten vielversprechender als in Studien an Fibroblastenkulturen (201). In tierexperimentellen Studien konnte die Arbeitsgruppe von Rübe C.E. et al. an reparaturprofizienten und -defizienten Mäusen (C57BL6-Mäuse (Strahlenresistenter Wildtyp), SCID-Mäuse (strahlenempfindlich), BALB/c-Mäuse (eingeschränktes Reparaturvermögen)) die  $\gamma$ -H2AX-Methode zur Untersuchung der unterschiedlichen Strahlenempfindlichkeit von Organgeweben (Testis, Gehirn, Lunge und Dünndarm) *in-vivo* und *in-vitro* etablieren. Dabei war die Induktion von DSBs in Blutlymphozyten und im Organgewebe linear zur Strahlendosis und zeigte einen im Wesentlichen gewebsunabhängigen Verlauf. Darüber hinaus konnte die Arbeitsgruppe von Rübe C.E. et al. anhand präklinischer Mausmodelle zeigen, dass die DNA-Reparatur, gemessen in Lymphozyten für verschiedene solide Gewebe repräsentativ ist (202). Diese tierexperimentellen Untersuchungen bilden die Grundlage für die Etablierung eines klinischen Tests zur Prädiktion der Strahlenempfindlichkeit eines Individuums und stellen die Grundlagen für diese Arbeit dar.

### 5.1. $\gamma$ -H2AX Foci Analyse - Prädiktion für die individuelle Radiosensitivität

#### 5.1.1 Voraussetzung der $\gamma$ -H2AX-Analyse als prädiktiver Test *in-vivo* und *in-vitro*

Mit Hilfe von definierten *in-vitro* Bestrahlungen wurde gemeinhin die Voraussetzung der  $\gamma$ -H2AX-Analyse als prädiktiver Test zur Detektion eines Strahlenschadens *in-vivo* überprüft. Dabei sind grundlegende Betrachtungen der Unterschiede in der Dosis-schadensantwort von Lymphozyten *in-vivo* und *in-vitro* notwendig.

Die Ergebnisse der *in-vitro*-Experimente in Abb. 4.7 bestätigen gemeinhin die lineare Dosis-effekt-beziehung der  $\gamma$ -H2AX-Foci in einem Dosisrange von 0-500 mGy nach *in-vitro* Röntgenbestrahlung (90 kV) von Blutlymphozyten. In halblogarithmischer Darstellung in Abb. 4.6 zeigen die Verläufe der *in-vitro* und *in-vivo* Lymphozytenkulturen einen

vergleichbaren exponentiellen Foci-Verlust als Ausdruck ablaufender Reparaturvorgänge. Die induzierte Foci-Zahl in den Lymphozyten 30 min nach Dosisexposition und die Kinetik des Foci-Verlusts waren vergleichbar mit den Verlustkinetiken der Fibroblastenkulturen, interpretiert als eins-zu-eins-Korrelation zwischen radiogen induzierten  $\gamma$ -H2AX-Foci und DSBs (1,77,100). Ein  $\gamma$ -H2AX-Foci-Verlust konnte in der in-vivo Versuchsreihe bis 24 Stunden und in der in-vitro Versuchsreihe bis 5 Stunden nach Bestrahlung beobachtet werden. Bei längeren Reparaturzeiten traten vor allem Probleme mit der Zellkultivierung auf, meist verbunden mit einer schlechten Qualität der Immunfluoreszenz der Proben in der Immunfluoreszenzmikroskopie.

Betrachtet man den Reparaturverlauf der  $\gamma$ -H2AX-Foci aller in-vitro-Proben genauer, so weichen die Steigungen der linearen Fits niedriger Bestrahlungsdosen (10 mGy) von den höheren Dosen ab, was auf ein unterschiedliches Reparaturausmaß für niedrige Bestrahlungsdosen oder auf ein nicht ausreichendes Signal-zu Rauschverhältnis hindeutet (Abb. 4.6). Dabei liegt der Dosiswert von 10 mGy ( $0,109 \pm 0,014$  F/Z) nur gering über dem Kontrollwert ( $0,058 \pm 0,006$  F/Z). Unbestrahlte Lymphozyten und Fibroblasten zeigen mit geringer Variabilität im Mittel geringe Levels an Foci von etwa 0,1 F/Z auf. Bei Induktionen von 0,2-0,4 F/Z durch 10 mGy sind niedrige Dosen sensitiv detektierbar (1,15,77). Die Sensitivität dieses Testverfahrens ist zum einen zelltypabhängig und durch die Variabilität der Foci-Level in den unbehandelten Zellen limitiert. Bei aktiv proliferierenden Zellen oder Tumorzelllinien kann der Hintergrund erhöht sein und sich dadurch die sensitiv detektierbare Dosis auf einige Hundert mGy verschieben (102).

Darüber hinaus ist zu erwähnen, dass diese Abschätzungen nur für innerhalb einer Stunde nach Strahlenexposition gewonnene Blutproben gelten, da die Foci-Kinetik einen biphasischen Verlauf mit bis zu 50% Foci-Verlust innerhalb einer Stunde aufweist (siehe Abb. 4.3 a und b). Diesem folgt ein langsamer Verlust auf etwa 30% residuale Foci nach einigen Stunden. 24 Stunden nach Exposition sind die residualen Foci höher als der Hintergrundlevel, vor allem für Dosen von einigen hundert mGy. Im Dosisbereich von 100-500 mGy liegen die Foci-Werte nach 5 Stunden noch etwa 5-15-fach über dem Hintergrundlevel. Eine Aussage über einen erhöhten Hintergrundlevel kann aufgrund der fehlenden Auswertung unserer in-vitro Daten nach 24 Stunden nicht gemacht werden. Dennoch ist zu beobachten, dass höhere Bestrahlungsdosen in der halblogarithmischen Darstellung mit geringerer Steigung des exponentiellen Abfalls einen langsameren  $\gamma$ -H2AX-Foci-Verlust bedingen (siehe Abb. 4.6).

Aus der in-vivo Reparaturkinetik geht hervor, dass der Restfocianteil nach der Reparaturzeit von 24 Stunden bei etwa 0,89% lag. Bhogal et al. zeigten an radiosensitiven (SCID und BALB/c) und radioresistenten (C57BL/6 und C3H/HeJ) Zelllinien von Mäusen, dass die relative Radiosensitivität in-vivo durch persistierende residuale  $\gamma$ -H2AX-Foci bestimmt wird (166). In einer vorangegangenen Pilotstudie von Rübe C.E. et al. zur DNA-Reparatur bei tumor Erkrankten Kindern wurde dargestellt, dass die Methode vermutlich die individuelle Radiosensitivität, repräsentiert durch die individuelle DSB-Reparatur, auch am Menschen vorherzusagen und Patienten mit genetisch bedingten Reparaturdefekten anhand residualer Foci-Level nach 24 Stunden zu identifizieren vermag (203).

In der vorliegenden Arbeit erreichten die Patientinnen 24 h nach in-vivo -Strahlenexposition alle ihren natürlichen Foci-Hintergrundlevel. Ein erhöhter Anteil residualer  $\gamma$ -H2AX-Foci konnte bei einer abgeschätzten Dosis von etwa 106 mGy bei keiner Patientin nachgewiesen werden (s.a. Kapitel 4.4).

### 5.1.2 Grenzen der $\gamma$ -H2AX-Analyse

Abgesehen von den vielen Vorteilen der RIF-Bestimmung als Marker für DSBs weist die Methode der Immunfluoreszenz auch Grenzen auf, die bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden müssen.

Rübe C.E. et al. beobachteten - konsistent mit früheren  $\gamma$ -H2AX-Studien an Mausgeweben (202,204–207) - dass im Vergleich zur PFGE mit 35-40 DSBs pro Kern und pro Gy (1) eine deutlich niedrige Fociinduktion von etwa 8 Foci pro Gy unter Anwendung der Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt werden kann. In der vorliegenden Arbeit an menschlichen Lymphozyten ergibt sich bei Extrapolation der Daten der Eichgerade der in-vitro-Proben (siehe Abb. 4.7 ( $y = 0,06 + 0,006 \times x$ )) eine Fociinduktion von etwa 6 Foci pro Gy.

Bislang wurde vermutet, dass die Unterschätzung der RIF-Level vor allem durch Unterschiede im DNA-Umfang von Mäusen, der Aufarbeitungszeit und Fixierung der untersuchten Organe, sowie der Zählgenauigkeit unter dem Lichtmikroskop durch Zellüberlagerungen in der Gewebeinbettung resultieren (202,206,207). Zur Interpretation unserer Ergebnisse konnte eine beobachterabhängige Variabilität bei der Auswertung der gezählten  $\gamma$ -H2AX-Foci-Daten ausgeschlossen werden. Im Rahmen der statistischen Schwankungen unterstreicht der konstante Hintergrund ( $\pm 0,006$  F/Z) in Abb. 4.2 die qualitative Wertigkeit der immunfluoreszenzmikroskopischen Methode auch in menschlichen Zellen zur Bestimmung radiogen induzierter  $\gamma$ -H2AX-Histone in der Umgebung von DSBs.

Im Gegensatz zu den DSBs können jedoch auch einzelsträngige DNA-Bereiche in Replikationsgabeln über die Aktivierung von ATR zur Phosphorylierung von H2AX beitragen (208). Des Weiteren können im Rahmen aktiver Zellzyklus-Phasen phosphorylierte H2AX Moleküle als Foci beobachtet werden, die nicht im Zusammenhang mit DNA-Reparaturvorgängen stehen (209). Weitergehend kommt es während der DNA-Fragmentation im Rahmen der Apoptose auch zur Phosphorylierung von H2AX-Molekülen (210). Somit stellen die RIFs nicht immer die tatsächliche DSB-Zahl und deren Reparatur dar (204).

### ***Einfluss des Zeitpunktes der $\gamma$ -H2AX-Foci-Analyse und Bestimmung der Foci-Induktion***

$\gamma$ -H2AX-Foci können mit einer mikroskopischen Ausdehnung von etwa 0,2  $\mu$ m wenige Minuten nach Bestrahlung gemessen werden (211). Es existieren verschiedene Angaben aus Studien über maximale Scheitelwerte von Foci-Level, welche sich von etwa 3-10 Minuten bis hin zu 30-60 Minuten nach Strahlenexposition bewegen. Dabei beeinflussen im Wesentlichen unterschiedliche biologische Charakteristika (Zahl phosphorylierter H2AX-Moleküle, Zelllinienart), Immunfärbungsprotokolle, optisches Zubehör des Mikroskops und die Variabilität bildgebender Analysen die Auswertung der Foci-Signale vor allem im kurzen zeitlichen Abstand zur Strahlenexposition. Die RIFs weisen innerhalb der ersten Stunde nach Exposition kaum ein Reparaturzeichen auf. DSBs entstehen dagegen unmittelbar nach der Strahlenexposition. Bei der PFGE können daher DSB unmittelbar nach Bestrahlung gemessen werden. Die PFGE zeigt trotz höherer Bestrahlungsdosen eine Abnahme der DSBs als Ausdruck ablaufender Reparaturvorgänge innerhalb von 20 bis 30 Minuten (3,63,64). Nach etwa 60 Minuten nach Bestrahlung ergibt sich eine große Diskrepanz zwischen der PFGE gemessenen DSBs und in der Immunfluoreszenz gemessener  $\gamma$ -H2AX-Foci. Ein günstiger Zeitpunkt liegt bei etwa 30-60 min nach Strahlenexposition, da die überwiegende Anzahl der Foci noch vorhanden und eine Größe und Intensität erreichen, welche eine gute qualitative und quantitative Auswertung erlauben. Die verzögerte  $\gamma$ -H2AX-Kinetik entsteht damit aus der benötigten Zeit zur biochemischen Ausbildung der Foci. Nachteil des Messpunktes nach 30 bis 60 min ist jedoch, dass bereits „einfache“ DSBs sehr schnell repariert werden können, so dass eine versteckte Reparatur vor dem Messintervall innerhalb 30-60 Minuten nach Strahlenexposition eine Unterschätzung des „echten“ DSB-Induktionslevels bedingen kann (60).

Die RIF-Formationen folgen damit nicht direkt physikalischen Vorgängen an den Bruchenden der DNA, sondern stellen vielmehr begleitende Chromatin- und metabolische Veränderungen dar, welche im Rahmen der Initiierung der DNA-Schadensantwort



entstehen (212,213). Dieser Unterschied in der Induktion nach 60 min kann durch chemische oder genetische Veränderungen, die die Phosphorylierungs-Kaskade von H2AX betreffen, noch vergrößert werden (66).

Ein Scheitelwert der Fociinduktion konnte nach WBRT in-vivo als auch nach definierter in-vitro Bestrahlung zuverlässig gemessen werden. Nach 2,5 Stunden und 5 Stunden war in allen Proben die Zahl der  $\gamma$ -H2AX-Foci pro Zelle geringer als 30 Minuten nach Strahlenexposition. Da jedoch keine weiteren Foci-Bestimmungen im Zeitraum von 0 bis 30 min und 30 bis 60 min nach Bestrahlung vorgesehen waren, kann in dieser Studie im Vergleich zu den Studien von Rothkamm et al. keine Aussage über die tatsächliche maximale Foci-Induktion und deren Intensität für den Zeitraum von 30 bis 60 Minuten nach Strahlenexposition getroffen werden.

Zur Erstellung der Reparaturkinetik wurden in der vorliegenden Arbeit nur längere Reparaturzeitpunkte wie 2,5 h, 5 h und 24 h betrachtet, so dass der oben dargestellte Sachverhalt der verzögerten  $\gamma$ -H2AX-Formation keine direkte Auswirkung auf die Ergebnisse haben dürfte. Der Kinetikverlauf und das Vorhandensein residualer Focilevel nach 24 Stunden sollte daher auch in dieser Arbeit die individuelle Reparaturkapazität einer Patientin widerspiegeln.

Es zeigte sich, dass der zeitabhängige  $\gamma$ -H2AX-Foci-Verlust (Abb. 4.3 a und b) als Marker für die individuelle DSB-Reparatur in den Blutlymphozyten der Patientinnen zuverlässig bestimmt werden konnte. Die individuellen in-vivo-Kinetiken für den Foci-Verlust wurden über alle Patientinnen gemittelt und zeigten einen ähnlichen Verlauf wie in vorangegangenen klinischen in-vivo Studien an Blutlymphozyten von HNO-Patienten und früheren in-vitro Studien an Fibroblastenkulturen (15,59,77). Löbrich et al. konnten zeigen, dass die in-vivo Reparatur in Lymphozyten mit der in der Literatur publizierten in-vitro Reparatur in Fibroblastenkulturen übereinstimmt und der Foci-Verlust die individuelle DSB-Reparatur reflektiert. Eine ausgeprägte individuelle Streuung der gemessenen Daten nach 60 Minuten wurde von Löbrich et al. als interindividuelle Variation der Reparaturkapazität interpretiert (15). Unsere Ergebnisse weisen nach Normierung auf das bestrahlte Volumen von 1000 cm<sup>3</sup> in Abb. 4.11 und im Vergleich der Reparaturhalbwertszeiten in Abb. 4.12 auch bei Patientinnen mit Mammakarzinom auf ein interindividuell unterschiedliches Reparaturverhalten hin.

Es stellt sich noch die Frage, in wie weit die DNA-Reparaturkinetik, gemessen in Blutlymphozyten letztlich repräsentativ für andere Organe oder Gewebe ist. Rube C.E. et al. konnten identische DNA-Reparaturkinetiken in verschiedenen Organen

reparaturdefizienter Mäuse mit der Immunfluoreszenz-Analyse demonstrieren und in präklinischen Mausmodellen auf verschiedene solide Gewebe übertragen. Diese Ergebnisse unterstreichen eine vergleichbare, genetisch determinierte DNA-Reparatur in verschiedenen Gewebetypen.

### ***Einfluss der Strahlenqualität auf die DSB-Induktion und deren Reparatur***

Die Reparaturkinetik der in vitro-Bestrahlungsserie (40 mGy) wurde auf die Induktion nach 30 Minuten normiert, so dass ein Vergleich der prozentualen DSB-Reparatur in-vivo und in-vitro ausgehend vom Induktionswert möglich ist.

Ein Blick auf die normierte DSB-Reparaturkinetik der 40 mGy in vitro und der in-vivo-Proben (Abb. 4.3, Abb. 4.5) zeigt, dass zwischen den durch 90 kV-Röntgenstrahlung und 6 MeV-Photonenstrahlung induzierten DSBs kaum Unterschiede in der Reparaturkinetik bestehen. Rothkamm et al. zeigte, dass das Auftreten der  $\gamma$ -H2AX-Foci in einem Dosisbereich von 150-240 kV unabhängig von der Strahlenqualität ist und das Modell auf Röntgenstrahlen (120 kV) in der CT-Diagnostik übertragbar ist (77). In Experimenten an Blutlymphozyten von Tumorpatienten im Rahmen computertomographischer Diagnostikuntersuchungen und Analysen individueller Serien unterschiedlicher CT-Phasen mit konsekutiven Dosis-Längen Produkten (DLP) konnten Löbrich et al. zeigen, dass auch im Niedrigdosisbereich ein proportionaler Zusammenhang zwischen der Anzahl induzierter Foci und dem DLP besteht und die klinische Anwendung in-vivo zulässt (15).

Kegel et al. konnten verdeutlichen, dass die Induktion von DSBs und die biologische Wirkung von ionisierender Strahlung von dem tatsächlich vorherrschenden Photonspektrum der Strahlung<sup>12</sup> und den unmittelbar räumlich umgebenden Materialien<sup>13</sup> durch emittierende Sekundärelektronen infolge von Wechselwirkungsprozessen zwischen Strahlung und Materie abhängig ist (214). Die Reparaturkinetik der mit 25kV-, 120 kV- und 137-Cs-Strahlung bestrahlten Zellen waren in dieser Studie auch an reparatur-defizienten Mäusen annähernd gleich, so dass man davon ausgeht, dass die Sekundärelektronen in einem Energiebereich von 15 bis 660 keV keine zusätzlichen komplexen DSBs induzieren. Die Reparatur der mit weicher Röntgenstrahlung bestrahlten Zellen lief hingegen langsamer ab und ließ daher vermuten, dass durch eine Strahlung mit höherer Ionisationsdichte<sup>14</sup> und damit verbundener höherer relativer biologischer Wirksamkeit (RBW) komplexere DSB induziert und komplexere biologische Endpunkte durch Verknüpfung nicht zugehöriger DNA-Enden wie chromosomale

---

12 hochenergetische Photonenstrahlung, Röntgen-kV-Strahlung (50-120 kV), ultraweiche Röntgenstrahlung.

13 Glas- und Plastikbehälter oder Kontrastmittel.

14  $\alpha$ -Strahlung (korpuskuläre Strahlung, Heliumkerne), Ck-Strahlung (carbon K ultrasoft X rays, 0.28 keV)).

Translokationen, neoplastische Transformationen und dizentrische Chromosomen resultieren (214–217). In unserer Versuchsreihe wurde die WBRT mit 6-23 MV Photonenstrahlung durchgeführt, welche eine vergleichbare RBW von 1 wie 120 kV-Röntgenstrahlung aufweist. Dennoch bleibt unklar in wie weit die Sekundärelektronen durch den in diesem Energiebereich vorherrschenden Compton-Effekt, anders als der Photoeffekt im kV-Bereich, aufgrund unterschiedlicher absorbierender Gewebe des Thorax einen abweichenden Einfluss auf die DSB-Induktion und die Reparatur der in-vivo Bestrahlung haben. Diese These kann zumindest durch den vergleichbaren  $\gamma$ -H2AX-Foci Kinetikverlauf in Abb. 4.3 und Abb. 4.5 für die Reparatur von DSBs der in-vitro kV-Bestrahlung und der in-vivo MeV-Bestrahlung nicht bestätigt werden.

### **5.1.3 Charakterisierung der zellulären Radiosensitivität – Implikation für die akute Radiodermatitis**

Nach meinem Kenntnisstand existieren bis heute in-vivo keine vergleichbaren klinisch-experimentellen Studien zur Korrelation der individuellen DSB-Reparatur (DSBs induziert bei einer Einzelbestrahlungsfraction) und dem Auftreten einer akuten Radiodermatitis beim Mammakarzinom. Die Beziehung der individuellen Radiosensitivität und akuter Strahlennebenwirkungen bei Brustkrebspatientinnen erscheint in der Literatur als ungesichert (218). Eine kürzlich publizierte Studie zum Stellwert der  $\gamma$ -H2AX-Foci-Methode als prädiktivem Test vor Bestrahlungen bei Brustkrebspatientinnen konnte in-vitro keinen Zusammenhang mit radiogenen Spättoxizitäten nachweisen (219). Hoeller et al. zeigten dagegen anhand von in-vitro Untersuchungen an radiogen induzierten Chromosomenabberationen in Blutlymphozyten zumindest eine Beziehung zur radiogenen Gewebsfibrose als Spätnebenwirkung auf (220).

Im Gegensatz zur Untersuchung von Späteffekten zeigten die überwiegende Anzahl der Studien keine Korrelation bzgl. der Endpunkte Radiosensitivität und dem Risiko für das Auftreten akuter Nebenwirkungen (221–224). Auch eine Studie von Opitz et al, 2001 (225) zeigte zwar eine positive Korrelation der Endpunkte, die jedoch in Folgeuntersuchungen nicht bestätigt werden konnte (226). Bei all diesen Studien wurde die individuelle Radiosensitivität in Fibroblastenkulturen bestimmt und ist somit nicht direkt auf unsere Daten übertragbar. Borgmann et al. publizierten zuletzt 2008 in vitro Daten, welche einen positiven Zusammenhang zwischen der individuellen Strahlenempfindlichkeit und akuten Hautreaktionen in der Strahlentherapie des Mammakarzinoms zeigten (218).

Durch den Zusammenhang der phosphorylierten Histonvariation H2AX und deren Verlust im Zuge der Reparatur von DSBs können Parameter der exponentiellen Verlustkinetik wie die Reparaturhalbwertszeiten (RHWZ) und das Ausmaß residualer  $\gamma$ -H2AX-Foci 24 Stunden

nach Strahlenexposition, als Indikatoren für die DSB-Reparaturkapazität eines Individuums betrachtet werden.

Yokota et al. beschreibt in Untersuchungen an Tobacco-Zellen, dass die Datenpunkte der Reparaturkinetik radiogen induzierter  $\gamma$ -H2AX-Foci durch einen Fit einer biphasisch exponentiellen Funktion sehr gut repräsentiert werden (195). Unsere Messdaten bestätigten auch für menschliche Blutzellen in Abb. 4.3 in-vitro und in-vivo gemeinhin diesen exponentiellen Verlauf des  $\gamma$ -H2AX-Foci Verlustes. Dabei konnten in halblogarithmischer Darstellung durch einen linearen Fit der logarithmierten Foci-Mittelwerte zwei Reparaturphasen mit unterschiedlichen Steigungen angegeben werden.

Zur Evaluation und zum Vergleich der individuellen DSB-Reparaturkapazitäten wurde als Maß für die Radiosensitivität das Verhältnis der reparierten DSBs zwischen 0,5 und 24 h nach der ersten Bestrahlungsfraction ( $RQ_{total} \frac{24\ h}{0,5\ h}$ ) und die RHWZ für die schnelle und

langsame Komponente der DSB-Reparatur ( $t_{\frac{1}{2},\ schnell}$  und  $t_{\frac{1}{2},\ langsam}$ ) bestimmt. Nach vorangegangenen Studien von Hoeller et al. zur zellulären Radiosensitivität und radiogenen Späteffekten wird auch in dieser Arbeit basierend auf der Gausschen Normalverteilung angenommen, dass ein erhöhtes Risiko zur Ausprägung von radiogenen Nebenwirkungen bei Patientinnen besteht, deren Rate an unreparierten DSBs nach 24h ( $RQ_{total} \frac{24\ h}{0,5\ h}$  Index)

mehr als eine Standardabweichung vom Mittelwert abweicht. Demnach können 2 Gruppen mit niedriger bis mittlerer und hoher zellulärer Radiosensitivität gebildet werden. Jeweils stellen der Mittelwert minus die Standardabweichung und der Mittelwert plus die Standardabweichung die „cut-off“-Punkte dar (220). In unserer Studie befanden sich die meisten Patientinnen in der Gruppe der niedrigen bis mittleren zellulären Radiosensitivität mit einem  $RQ_{total} \frac{24\ h}{0,5\ h}$  von  $\leq 0,039$ . Es waren insgesamt 4-mal so viele Patientinnen in der

Gruppe der niedrigen Radiosensitivität (14 vs. 3, 82% vs. 18%) als in der Gruppe der erhöhten Radiosensitivität. Nach Berechnung des mittleren RQ-Index für Patientinnen mit einer Radiodermatitis  $\leq 2$ . Grades (leicht) und  $\geq 3$ . Grades (schwer) ergaben sich zwischen den beiden Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede ( $0,024 \pm 0,010$  vs.  $0,015 \pm 0,006$ ,  $p = 0,42$ ). Eine Radiodermatitis  $\geq 3$ . Grades war in 66% der radiosensitiven Patientinnen und 58% der radioresistenteren Patientinnen nachweisbar. Es zeigt sich für die Gruppe der radiosensitiven Patientinnen dennoch ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer akuten Radiodermatitis  $\geq 3$  Grades (66% vs. 33,3%). Ergänzend zeigt sich in Abb. 4.14 und Abb. 4.15, dass die Patientinnen mit erhöhter Hauttoxizität (Summengrad  $\geq 3$ ) offensichtlich zu Beginn DSBs zwar schneller reparieren als die Patientinnen mit niedrigen

Hautreaktionen (Summengrad  $\leq 2$ ), jedoch im Verlauf eine Verlängerung der langsamen Reparaturhalbwertszeit ( $t_{1/2, \text{ langsam}}$ ) aufweisen, die etwa 0,8 Stunden länger als bei Patientinnen mit niedriger Hauttoxizität ist. Diese Ergebnisse der Verlängerung der langsamen Reparaturphase von 5 bis 24 Stunden nach Strahlenexposition mit residualen Foci könnten auf eine kritische Rolle in der genetisch bedingten individuellen Reparaturkapazität und der Inzidenz einer akuten Radiodermatitis hinweisen. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass bei keiner der untersuchten Patientinnen im Vorfeld eine Erkrankung diagnostiziert wurde, die nachweislich mit einer erhöhten Radiosensitivität assoziiert ist. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Patientinnen mit Dermatitis  $\geq$  Grad 3, möglicherweise auch durch größere Bestrahlungsvolumina und Dosisinhomogenitäten bedingt, nicht zwingend eine erhöhten  $\gamma$ -H2AX-Foci-Induktion oder verlangsamte DSB-Reparatur aufweisen. Zusammenfassend konnte auch nach Normierung auf ein einheitliches Bestrahlungsvolumen (Abb. 4.11) keine Patientin identifiziert werden, welche nachweislich einen Reparaturdefekt mit residualen Foci nach 24 Stunden und außergewöhnlich starken Hautreaktionen aufwies. Dessen ungeachtet reflektiert jeder der Parameter  $RQ_{\text{total}} \frac{24 \text{ h}}{0,5 \text{ h}}$ ,  $t_{1/2, \text{ schnell}}$  und  $t_{1/2, \text{ langsam}}$  die DSB-Reparaturkapazität, aber keiner korreliert in unserem Patientinnenkollektiv mit dem Schweregrad der akuten Radiodermatitis nach Bestrahlung der Brust.

Aufgrund der kleinen Fallzahl in unserer Studie ist eine statistische Auswertung und Interpretation der Daten nur im Ansatz möglich. Dies könnte eine Erklärung für die fehlende Korrelation zwischen DSB-Reparatur und der Radiodermatitis in der vorliegenden Arbeit sein. Für einen statistisch signifikanten Nachweis ist eine weitere Untersuchung mit einem größeren gleichverteilten Patientenkollektiv notwendig.

In der Abb. 4.9 erkennt man, dass für das Induktionsplateau von  $\gamma$ -H2AX Foci das dosisexponierte Blutvolumen und der Durchfluss an Lymphozyten auch eine Rolle spielt. Der zeitliche Reparaturumfang der  $\gamma$ -H2AX-Foci bleibt dagegen in gleichem Maße erhalten. Die Unterschiede in der  $\gamma$ -H2AX-Foci-Induktion, mit Hilfe der Erstellung einer in-vivo Reparaturkinetik und der Anwendung der kontaminierten Poisson-Verteilung, zeigen eine gute Korrelation von strahleninduzierten  $\gamma$ -H2AX-Foci und Größe bestrahlter Blut- oder Organvolumina. Damit wird die Notwendigkeit der Normierung auf ein einheitliches Bestrahlungsvolumen zur Detektion residualer  $\gamma$ -H2AX-Foci von radiosensitiven Patienten bei der Bestrahlung im Thoraxbereich unterstrichen.

Die Schwankungen der individuellen Reparaturhalbwertszeiten, die individuellen  $\gamma$ -H2AX-Foci-Verlustkinetiken (Abb. 4.12), und der unterschiedliche Ausprägungsgrad an

Hautreaktionen durch Patientinnen mit normaler Radiosensitivität, können (auch nach Normierung auf einheitliche Bestrahlungsvolumina) radiosensitive Patientinnen mit erhöhten radiogenen Nebenwirkungen in der klinischen Anwendung der Methode verhüllen. Dikomey et al. demonstrierte für Patienten mit unterschiedlicher Ausprägung von Spätnebenwirkungen, dass die individuelle Radiosensitivität sich in klinischen Studien nicht als wesentlicher Faktor herausstellt. Der Grund dafür ist, dass die Minderheit der Patienten mit erhöhter Strahlenempfindlichkeit, verbunden mit dem Risiko zur Ausbildung schwerer radiogener Komplikationen, der Mehrheit der Patienten mit normaler Strahlenempfindlichkeit, die ebenfalls das Risiko für schwere radiogenen Nebenwirkungen besitzen, zahlenmäßig unterlegen ist. Dies könnte erklären, warum auch in der vorliegenden Studie keine enge Korrelation zwischen der DSB-Reparatur und dem Grad der radiogenen Dermatitis zu finden ist (227). Ein wesentlicher Unterschied zu größeren Studien ist vor allem das Fehlen ausgeprägter Hautreaktionen in unserer Population. In einer prospektiven Kohorten-Studie an 478 Patientinnen von Twardella et al. zeigten nur etwa 0,4% (n=2) eine Radiodermatitis  $\geq 3$ . Grades. Dabei waren der Hintergrund-DSB-Schaden, der initiale DSB-Schaden und die Reparaturkapazität nicht mit dem Risiko der klinischen Radiosensitivität assoziiert (91). In Studien von Oppitz und Alapetite et al. konnte letztlich nur anhand selektierter Patientenkollektive mit erhöhten radiogenen Nebenwirkungen der Haut ( $\geq$  Grad 3) eine positive Korrelation von residualer DNA-Schädigung und einer erhöhten klinischer Radiosensitivität nachgewiesen werden (42,228).

Akute Nebenwirkungen der Haut sind möglicherweise weniger direkt mit der genetischen Prädisposition assoziiert als radiogene Spätfolgen. Dabei spielt wohlmöglich die Interobserver-Variabilität in der Beurteilung des Ausprägungsgrads von Hautnebenwirkungen auch eine wichtige Rolle (91). Die Beurteilung der radiogenen Hautreaktion ist meist nur durch strenge beobachtergebundene Dokumentation oder technische Hilfsmittel wie die Reflektionsspektrophotometrie objektivierbarer (229,230). Letztendlich ist auch die Pathophysiologie der klinisch akuten Radiodermatitis der Brust im Detail sehr komplex (231).

Andere prognostische Faktoren als die intrinsische Radiosensitivität können auch zum Risiko der Ausprägung einer akuten Radiodermatitis beitragen. Die Strahlentherapie der Brust ist im Vergleich mit anderen Bestrahlungsindikationen (wie beispielsweise der Radiotherapie von Kopf-Hals-Karzinomen) gekennzeichnet durch größere interindividuelle Unterschiede der Bestrahlungsvolumina, welche indirekt mit der Brustgröße und dem Body-Mass-Index assoziiert sind und im direkten Zusammenhang mit akuten Hautreaktionen stehen. Andere Faktoren wie beispielsweise die zusätzliche Behandlung der

Lymphabflusswege, die Dosisescalation im Rahmen der zusätzlichen Dosisaufsättigung, Hormontherapien, die Photosensibilität der Haut und Nikotinabusus zeigten dagegen keinen direkten Zusammenhang (91).

Eine systematische Auswertung des Zusammenhangs des Body-Mass-Index unseres Patientinnenkollektivs und resultierenden Bestrahlungsvolumina mit dem Ausmaß der akuten Radiodermatitis ist aufgrund fehlender Daten an dieser Stelle nicht möglich. Die Arbeit konnte jedoch zeigen, dass bei Patientinnen mit vermehrter akuter Radiodermatitis (Summenscore  $\geq 3$ ) größere Bestrahlungsvolumina verbunden mit einem größeren Planungszielvolumen (PTV) und größerer dosisbelasteter Brustvolumina (gemessen als umschließende 50% ( $V_{(50\%)}$ )- und 80% ( $V_{(80\%)}$ )-Isodose) vorlagen (Summenscore  $\geq 3$  vs. Summenscore  $\leq 2$ ,  $V_{(PTV)}$   $1501 \pm 138 \text{ cm}^3$  vs.  $1123 \pm 129 \text{ cm}^3$ ,  $p = 0,119$ ;  $V_{(50\%)}$   $1921 \pm 282 \text{ cm}^3$  vs.  $1536 \pm 187 \text{ cm}^3$ ,  $p = 0,275$ ). Eine statistische Signifikanz bestand möglicherweise aufgrund der kleinen Fallzahl allerdings nicht.

Die bestrahlten Volumina zeigen im Vergleich mit dem HNO-Kollektiv von Fleckenstein et al. (59) eine ausgeprägte individuelle Variabilität, welche durch nicht standardisierte Bestrahlungsfelder infolge unterschiedlicher Brustumfänge und anatomischer Lagevariationen zustande kommt. Im Unterschied zu dem in ähnlicher Weise untersuchten HNO-Kollektiv kommt es durch die tangentielle Gegenfeldtechnik meist zu einer homogenen Dosisauslastung der Brust. Neuere Techniken wie die IMRT, angewendet vor allem in der Therapie von Kopf-Halskarzinomen mit meist irregulären Dosisverteilungen, nehmen in der Strahlentherapie der Brust eine untergeordnete Stellung ein. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass auch physikalische äußere Faktoren, wie die Größe der Bestrahlungsvolumina zumindest einen Einfluss auf die Ausprägung einer akuten Radiodermatitis haben.

Einen innovativen Ansatz hat kürzlich die Arbeitsgruppe von Rübe C.E. et al. publiziert. Ihr gelang der Nachweis von Doppelstrangbrüchen mit der Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM), mit deren Hilfe verschiedene mit Gold markierte Reparaturkomponenten unterschiedlicher Chromatinstrukturen in intakten Kernstrukturen von Zellen in bestrahltem Mausgewebe unter physiologischen Bedingungen lokalisiert und deren physikalische Interaktionen untersucht werden können. Die hochauflösende TEM-Analyse zeigte, dass die RIF nicht die Sensitivität zur Detektion aller unreparierten DSBs besitzt. Nach Markierung der aktivierten Form des Ku70, welches unmittelbar an die Bruchenden der DNA zur Vorbereitung der Reparatur bindet, wurden vergleichbare Induktionswerte wie bei der PFGE gemessen. Damit ist die TEM in der Lage, phosphorylierte

pKu70- Cluster, abhängig von lokalen Chromatinformationen als unreparierte DSBs mit gezielten Goldmarkern nachzuweisen. Rübe C.E. et al. konnten außerdem zeigen, dass RIF-formende Reparaturfaktoren, wie  $\gamma$ -H2AX, 53PB1 oder MDC1, zum einen nur DSBs in der verpackten Form der DNA, dem Heterochromatin aufzeigen, und im Vergleich zum euchromatinen Zustand eine langsamere Reparaturkinetik besitzen. Allerdings ist die quantitative Analyse mittels TEM im Vergleich zur Foci-Analyse sehr aufwendig und daher als prädiktiver klinischer Test in dieser Form noch nicht umzusetzen (204).

## **5.2. $\gamma$ -H2AX-Foci – Implikationen für die biologische Dosimetrie**

Die Teilkörperexposition ist charakterisiert durch eine Mischung an bestrahlten und nicht bestrahlten Lymphozyten. Bei einer Ganzkörper-Strahlenexposition liegt eine zufällige Verteilung der DSBs und  $\gamma$ -H2AX-Foci vor, die durch die Poissonverteilung mathematisch beschrieben wird. Dabei können mathematische Tools, welche in der Vergangenheit für Chromosomenabberationen etabliert wurden (92), auch auf die  $\gamma$ -H2AX-Foci Verteilung zur Bestimmung der Überverteilung bzw. als Indikator einer Teilkörperexposition und zur Quantifizierung der Bestrahlungsfraction angewendet werden (77). Alle diese Beobachtungen konnten bislang nur für Blutproben bis 30 min nach Dosisexposition gemacht werden. Es ist nicht ganz klar, inwieweit die Fociverteilung nach einer Ganzkörperbestrahlung auch nach längerer Postexpositionszeit statistisch zufällig bleibt (102).

### ***DSB-Induktion und Beziehung zur Teil- und Ganzkörperbestrahlung***

Anders als bei radiologischen Untersuchungen mit definierter Strahlendosis als Dosislängenprodukt (DLP) in Körperanteilen wie beispielsweise bei CT-Untersuchungen der Lunge, sind Bestrahlungsfelder und dosisexponierte Volumina bei Strahlentherapiepatienten durch die Lage des Tumors, dessen potenzielle klinische Ausbreitung sowie die Anordnung der Bestrahlungsfelder festgelegt. Bei der Bestrahlung des Brustdrüsenkörpers spielt im Gegensatz zu anderen Tumoren, wie beispielsweise im HNO-Bereich, die anatomische Lagebeziehung zu den großen Gefäßen des Herzens mutmaßlich eine entscheidende Rolle in Hinsicht auf den Anteil bestrahlter Lymphozyten und somit der  $\gamma$ -H2AX-Foci-Induktion. Darüber hinaus kommt es zu weitaus größeren interindividuellen Unterschieden im Umfang des Brustdrüsengewebes, so dass eine Normierung auf ein definiertes Bestrahlungsvolumen zum quantitativen Vergleich sinnvoll erscheint.

In unserer Versuchsreihe ergab sich im Mittel ein Foci-Level unbestrahlter Blutproben von  $0,06 \pm 0,006$  F/Z, was gemeinhin bestätigt, dass unbestrahlte periphere mononukleäre



Zellen in stationären Phasen sehr kleine Foci-Level von 0,1 F/Z oder weniger aufweisen (1,15,77). Bei Induktionswerten von  $0,109 \pm 0,014$  F/Z nach 10 mGy, in der Literatur mit durchschnittlich 0,2-0,4 F/Z angegeben (1,77), ist die  $\gamma$ -H2AX-Foci-Methode auch hier in der Lage Strahlendosen von wenigen mGys zu detektieren.

Die in-vivo Teilkörperbestrahlung der Mamma zeigte in der Poissonverteilung (Abb. 4.8 b) eine nicht zufällige Verteilung der  $\gamma$ -H2AX-Foci und damit eine Abweichung von der statistischen Poissonverteilung in den analysierten Zellen.

In den in-vitro bestrahlten Blutproben dagegen konnte wie in den Daten von Rothkamm et al. (77) in den höheren Bestrahlungsdosen von 20 und 100 mGy eine statistische Poissonverteilung der  $\gamma$ -H2AX-Foci als Indikator für stochastisch radiogen induzierte Fociformationen nach homogener Strahlenexposition beobachtet werden. Für kleine Bestrahlungsdosen kleiner 20 mGy war die statistische Poissonverteilung durch die hohe Anzahl an nicht geschädigten und nicht exponierten Zellen nicht aussagekräftig.

Nach Anwendung der Methode der kontaminierten Poissonverteilung zeigte sich nach homogener Bestrahlung der in-vitro Proben in Tab. 4.5 eine Abweichung von der 100%-igen Bestrahlungsfraction von 3 bis 9%. Im Vergleich zu den Daten von Rothkamm et al. (77) könnte diese Abweichung sich in der experimentellen Methodik der in-vitro Bestrahlung der Blutproben begründen. In der Röntgenapparatur wurden die Blutproben mit 90 kV, 6 mA und einer Dosisrate von 70 Gy/min in liegender Position bestrahlt. Die liegende Position führt zu einer ungleichmäßigen Verteilung der Lymphozytenzellen im Reagenzglas und kann damit eine inhomogene Dosisabsorption der Zellen in der Blutprobe bedingen. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob in der Röntgenkammer überhaupt ein homogenes Bestrahlungsfeld mit konstanter Umgebungsdosisleistung zu jedem Zeitpunkt bestand. Die Bestrahlungsdosen wurden in den Vorstudien mittels Ionisationskammer und chemischen Dosimetern gemessen, welche eine Variationsbreite von etwa 15% aufwiesen (15). Anhand dieser dosimetrischer Messungen wurden Referenztabelle für Einstellparameter der Röntgenapparatur (angelegte Röhrenspannung in kV, Stromstärke in mA, Zeit) mit resultierender Dosisleistung (Gy/min) erstellt, welche als Grundlage für die Bestrahlung der Blutproben dienten. Dabei ist zu beachten, dass die Messwerte eines Dosimeters in Ionisationskammern durch zahlreiche Einflussgrößen wie beispielsweise Luftdruck, Luftfeuchte und Lufttemperatur beeinflusst werden. Damit sind in der Röntgenkammer tägliche Schwankungen der Dosisleistung und Feldinhomogenitäten während der in-vitro Bestrahlung möglich. Darüber hinaus bestehen grundsätzlich nach dem erweiterten Fehlerfortpflanzungsgesetz Messunsicherheiten eines Dosimeters innerhalb einer

Messreihe, die zu späteren Dosischwankungen in den Blutproben führen können.

Eine zusätzliche Auswertung der Daten der kontaminierten Poissonverteilung mittels Fit-Analyse wäre darüber hinaus notwendig, um die genaue Fehlerspannweite der Bestrahlungsfractionen zu evaluieren.

Die erhöhte Induktion an  $\gamma$ -H2AX-Foci abhängig von der behandelten Brustseite in Abb. 4.6a begründet sich mit Sicherheit durch unterschiedliche bestrahlte Volumenanteile blutführender Gefäßabschnitte des Herzens. Bei linksseitiger Brustbestrahlung sind im Gegensatz zur rechtsseitigen Brustbestrahlung größere Gefäßstrukturen des Herzens (Aorta, linker Ventrikel, linker Vorhof) strahlenexponiert. Die Durchblutung des Brustdrüsenkörpers spielt darin womöglich eine untergeordnete Rolle. Daraus resultiert die Tatsache, dass nach der kontaminierten Poissonverteilung die mittlere bestrahlte Fraktion der zirkulierenden Blutlymphozyten auf der linken Seite größer ist (rechte Mamma vs. linke Mamma, 47% vs. 52%). Meine Ergebnisse lassen vermuten, dass die Foci-Induktion bei der Bestrahlung des Mammakarzinoms von der bestrahlten Brustseite und damit direkt von der Dosisbelastung bestrahlter Blutanteile und vom Durchfluss an Lymphozyten abhängig ist.

Die Genauigkeit in der Abschätzung der Dosis anhand der in-vitro Eichgeraden wird durch die Genauigkeit der gemessenen Dosispunkte bestimmt. Mittels der kontaminierten Poissonverteilung wurden etwa 1,8-mal mehr F/Z abgeschätzt als im Vergleich zur in-vivo Direktmessung. Bei der kontaminierten Poissonanalyse ist für die endgültige Dosisabschätzung die Genauigkeit der erstellten Kalibrierungs- und Eichkurve von wesentlicher Bedeutung. In unseren Daten zeigt sich abhängig vom betrachteten Dosisäquivalent (100 mGy in-vitro Direktmessung: 1,12 F/Z; Berechnung nach der in-vitro Eichgeraden: 0,6 F/Z) eine Abweichung der geschätzten Dosis von 10-20% bis max. 99%.

Die Überschätzung der Induktions- und Teilkörperdosis anhand der kontaminierten Poissonverteilung im Vergleich zur in-vitro Eichkurve könnte auch aufgrund des oben beschriebenen unterschiedlichen Sekundärelektronenanteils im Bereich der bestrahlten Thorax- und Brustanteile bedingt sein. In dem vorbeschriebenen Abschnitt (5.1.2) über den Einfluss des Photonenspektrums und deren umgebenden Materialien auf die biologische Wirkung einer Bestrahlung wird deutlich, dass umgebende Strukturen im Bereich des Thorax wie Rippen, Lunge und Herzanteile, gekennzeichnet durch unterschiedliche Dichtewerte einen Einfluss auf den Anteil des emittierten Sekundärelektronenanteil haben können. Die Wechselwirkungsprozesse des vorherrschenden Compton-Effekts bei der hochenergetischen Röntgentherapie sind nicht von der Ordnungszahl, sondern von der Elektronendichte des durchstrahlten Materials abhängig. Die Brust ist ein Organ mit

geringen Dichtesprüngen, denen radiodiagnostisch in der Mammographie durch die Wahl niederenergetischer Röntgenstrahlung (ca. 25 kV) Rechnung getragen wird. Die angrenzenden Lungenabschnitte und Knochenstrukturen weisen dagegen große Dichtesprünge auf, wodurch eine erhöhte Comptonstreuung resultiert. Im niedrigen keV-Bereich konnte Kegel et al. nachweisen, dass das Reparaturausmaß von DNA-Schäden jedoch erhalten bleibt, und womöglich keine komplexeren DSBs induziert werden (214). In dieser Studie kann auch für den hochenergetischen Photonenbereich ein größerer sichtbarer Einfluss auf das Reparaturausmaß von DNA-Schäden, wie komplexere DSBs, anhand der dargestellten Foci-Verläufe über 5 bzw. 24 Stunden nicht beobachtet werden. Dennoch kann sich die unterschiedlich abgeschätzte in-vivo Induktion und Teilkörperdosis durch den verschiedenen Anteil der Comptonstreuung aufgrund umgebender Dichtestrukturen der brustnahen Thoraxanteile im Vergleich zur in-vitro Messung begründen.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Bestimmung der  $\gamma$ -H2AX Foci-Formation im Rahmen der fraktionierten Anwendung von hochenergetischer Röntgen- und Photonenstrahlung eine hochsensitive dosimetrische Messmethode darstellt. Sie erlaubt über die Erstellung einer in-vitro Eichkurve die Ermittlung der zu erwartenden mittleren in-vivo  $\gamma$ -H2AX-F/Z und die dosimetrische in-vivo Messung strahlenexponierter Blutanteile. Dabei ist es prinzipiell möglich, basierend auf dem  $\gamma$ -H2AX-Level in Blutproben zu verschiedenen Zeitpunkten die Lymphozytenzirkulation durch verschiedene Körperorgane zu untersuchen.

Darüber hinaus zeigt sich bei der Betrachtung der jeweiligen bestrahlten Brustseiten (rechts vs. links) ein Trend zur Korrelation von strahleninduzierten  $\gamma$ -H2AX-Foci und Größe bestrahlter Blut- oder Organvolumina. Damit kann mit Hilfe der statistischen Poissonverteilung zuverlässig eine Teilkörper- von einer Ganzkörperstrahlenexposition unterschieden werden. Für einen statistisch signifikanten Nachweis ist allerdings die Untersuchung eines größeren, gleichverteilten Patientenkollektivs notwendig. Der Einfluss der hochenergetischen Photonenstrahlung mit entstehender Sekundärstrahlung auf die Genauigkeit der abgeschätzten Teil- oder Ganzkörperdosis bleibt jedoch aufgrund ihrer Komplexität dennoch noch nicht ausreichend gut verstanden. Es ist darüber hinaus ohnehin zu klären in wieweit auch genotoxische Substanzen, wie radio- oder chemotherapeutische Verfahren oder Tabakkonsum (232,233) einen Effekt auf den Foci-Hintergrundlevel haben, und die Verwendung der Methode als biodosimetrisches Verfahren begrenzen.

### 5.3. Zusammenfassung und Ausblick

Mc Milian et al. beschreibt den DNA-Schaden „als das Herzstück des radiogenen Effektes“. Deshalb scheint die Untersuchung der DSB-Reparatur zur Detektion einer möglichen erhöhten Radiosensitivität gleichsam fundamental und viel versprechend zu sein (10).

Die Bestimmung der immunfluoreszenzmarkierten Foci ist abgesehen von der oben skizzierten, innovativen TEM-Methode, gegenwärtig die sensitivste Methode für die Analyse von  $\gamma$ -H2AX-Foci (211). Sie ermöglicht eine Bewertung der individuellen DSB-Reparatur in-vivo im Rahmen einer Bestrahlungsfraktion. Unterschiedliche residuale  $\gamma$ -H2AX Foci-Level nach 24 bis 48 Stunden nach Strahlenexposition und verschiedene RHWZ reflektieren die individuelle DSB-Reparaturkapazität und können die individuelle Radiosensitivität bestimmen und folglich eine Individualisierung des Therapieregimes ermöglichen (102). In diesem Zusammenhang ist jedoch aufgrund der Komplexität der Pathogenese der Normalgewebsreaktionen nicht geklärt, in welchem Umfang die primäre Foci-Induktion, sowie deren Reparatur (individuelle Reparaturkapazität), der Einfluss der protrahierten Strahlenexposition im Rahmen einer fraktionierten Strahlentherapie über 6 Wochen und das erhöhte Risiko für die Entwicklung einer akuten Hautnebenwirkungen durch größerer Bestrahlungsvolumina die individuelle Reparatursensitivität widerspiegeln. Rube C.E. et al. konnte an Mausgeweben zeigen, dass radiogen induzierte DSBs in akut- und spät reagierenden Geweben während einer Strahlentherapie gleichsam akkumulieren und genetisch determinierte DNA-Reparaturdefekte das Ausmaß der Akkumulation residualer DNA-Schäden nach fraktionierter Bestrahlung bestimmen (202). Die Übertragung dieser tierexperimentellen Beobachtungen auf den Menschen im Rahmen einer fraktionierten Strahlentherapie ist derzeit Gegenstand klinischer Studien der Arbeitsgruppe Fleckenstein et al. am UKS in Homburg.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie wurden an einer relativ kleinen Zahl von Patientinnen erhoben und sind aus diesem Grund letztlich nicht völlig konklusiv. Dennoch verdeutlicht diese Arbeit, dass die Methode der Analyse von radiogen induzierten Foci (RIF) im klinischen Kontext auch an einem Patientinnenkollektiv mit sehr individualisierten Bestrahlungsvolumina in-vivo anwendbar ist. Es scheint jedoch in diesem Patientinnenkollektiv mit einer DSB-Reparatur im normalen Umfang ähnlich wie bei der Studie von Fleckenstein et al. (59) keinen direkten prädiktiven Vorhersagewert über den Ausprägungsgrad der akuten Radiodermatitis der Brust bei der adjuvanten WBRT zu geben. Da sich eine Korrelation zwischen dem individuellem Reparaturverhalten und der Nebenwirkungsinzidenz im Hautbereich nicht direkt abbilden ließ, scheint die Methode den Ansprüchen eines prädiktiven Tests in dieser Studie nicht zu genügen.

Für die Etablierung als prädiktiv klinisches Testverfahren müssen gemeinhin fehlerunanfällige Prozeduren für die Blutasservierung, die Lagerung, Kultivierung - Färbeprotokolle und das mikroskopisch-bildgebende Verfahren weiterentwickelt und validiert werden.

Zukünftig könnte ein besseres Verständnis des Zusammenhangs des DNA-Schadens und höhergradiger Normalgewebsreaktion die Möglichkeit bieten, letztere im klinischen Alltag der Strahlentherapie zu vermeiden oder zu reduzieren.

## 6. Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 2.1:</b> Schematische Darstellung der zellulären Signal-Transduktionskaskade (104). ....	<b>20</b>
<b>Abb. 2.2:</b> Schematische Darstellung der Vorgänge des NHEJ und der HR (104). ....	<b>21</b>
<b>Abb. 2.3:</b> Häufigste Krebsformen im Saarland 2004-2006 – Neuerkrankungen (161).....	<b>29</b>
<b>Abb. 2.4:</b> Häufigste Krebsformen im Saarland 2004-2006 – Sterbefälle (161).....	<b>29</b>
<b>Abb. 3.1: a,b:</b> a) Lymphozytentrennung, Durchflusszytometrie (Seite 45) b)Immunfluoreszenzmikroskopisches Verfahren von Lymphozytenkernen .....	<b>49</b>
<b>Abb. 4.1:</b> $\gamma$ -H2AX Foci-Induktion in-vivo nach 30min. ....	<b>57</b>
<b>Abb. 4.2:</b> $\gamma$ -H2AX Foci-Hintergrundwerte - Kontrollprobe.....	<b>57</b>
<b>Abb. 4.3:</b> In-vivo Kinetik mittels $\gamma$ -H2AX-Methode. ....	<b>58</b>
<b>Abb. 4.4:</b> In-vivo Kinetik mittels $\gamma$ -H2AX-Methode in halblogarithmischer Darstellung. ....	<b>59</b>
<b>Abb. 4.5:</b> In-vitro DSB-Reparatur in Blutlymphozyten nach Röntgenbestrahlung mit 40 mGy. ....	<b>60</b>
<b>Abb. 4.6:</b> In-vivo DSB-Reparatur im Vergleich zur in-vitro DSB-Reparatur in humanen Blutlymphozyten.....	<b>60</b>
<b>Abb. 4.7:</b> Darstellung der dosisabhängigen Foci-Induktion.....	<b>61</b>
<b>Abb. 4.8:</b> $\gamma$ -H2AX-Foci-Verteilungsanalyse; Vergleich mit der Poissonverteilung .....	<b>63</b>
<b>Abb. 4.9:</b> Darstellung der DSB-Reparaturkinetik von Patientinnen mit Bestrahlung der rechten oder der linken Brust.....	<b>66</b>
<b>Abb. 4.10:</b> $\gamma$ -H2AX-Foci-Induktion nach 30 min für die rechte und linke Mammagruppe. ....	<b>66</b>
<b>Abb. 4.11:</b> Individuelle in-vivo Kinetik des $\gamma$ -H2AX-Foci-Verlust nach der WBRT mit 2 Gy über 24h.....	<b>69</b>
<b>Abb. 4.12:</b> RHWZ für die schnelle und langsame Komponente der DSB-Reparatur. ....	<b>69</b>
<b>Abb. 4.13:</b> Darstellung des Reparaturindex (RQ total $\frac{24\text{ h}}{0,5\text{ h}}$ ) in Bezug auf die akute Radiodermatitis der Brust.....	<b>72</b>
<b>Abb. 4.14:</b> Analyse der RHWZ für die schnelle Komponente. ....	<b>73</b>
<b>Abb. 4.15:</b> Analyse der RHWZ für die langsame Komponente. ....	<b>73</b>
<b>Abb. 4.16:</b> Absolute $\gamma$ -H2AX-Foci-Induktion gemessen nach 30 min - Vergleich der beiden Nebenwirkungsgruppen leichte bis moderate und schwere Toxizität.....	<b>74</b>

## 7. Literaturverzeichnis

1. **Rothkamm K, Löbrich M. 2003.** Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100(9):5057–62.
2. **Lee SE, Moore JK, Holmes A, Umez K, Kolodner RD, Haber JE. 1998.** *Saccharomyces* Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage. *Cell*, 94(3):399–409.
3. **Iliakis G, Wang H, Perrault AR, Boecker W, Rosidi B, Windhofer F, u. a. 2004.** Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet. Genome Res.*, 104(1-4):14–20.
4. **Rothkamm K, Löbrich M. 2002.** Misrepair of radiation-induced DNA double-strand breaks and its relevance for tumorigenesis and cancer treatment (review). *Int. J. Oncol.*, 21(2):433–40.
5. **Ward JF. 1990.** The yield of DNA double-strand breaks produced intracellularly by ionizing radiation: a review. *Int. J. Radiat. Biol.*, 57(6):1141–50.
6. **Hoeijmakers JH. 2001.** Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835):366–74.
7. **van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R. 2001** Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat. Rev. Genet.*, 2(3):196–206.
8. **Burma S, Chen DJ. 2004.** Role of DNA-PK in the cellular response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst.)*, 3(8-9):909–18.
9. **Dianov GL, O'Neill P, Goodhead DT. 2001.** Securing genome stability by orchestrating DNA repair: removal of radiation-induced clustered lesions in DNA. *Bioessays*, 23(8):745–9.
10. **McMillan TJ, Tobi S, Mateos S, Lemon C. 2001.** The use of DNA double-strand break quantification in radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 49(2):373–7.
11. **Frankenberg-Schwager M. 1989.** Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation. *Radiother Oncol.*, 14(4):307–20.
12. **Iliakis G. 1991.** The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *Bioessays*, 13(12):641–8.
13. **Ward JF. 1985.** Biochemistry of DNA lesions. *Radiat Res Suppl.* 1985;8:S103–11.
14. **Jeggo PA. 1998.** DNA breakage and repair. *Adv. Genet.*, 38:185–218.
15. **Löbrich M, Rief N, Kühne M, Heckmann M, Fleckenstein J, Rube C, u. a. 2005.** In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102(25):8984–9.

16. **Rich T, Allen RL, Wyllie AH. 2000.** Defying death after DNA damage. *Nature*, 407(6805):777–83.
17. **Jackson SP. 2002.** Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, 23(5):687–96.
18. **Olive PL. 1998.** The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiat. Res.*, 150(5 Suppl):S42–51.
19. **Kuzminov A. 1995.** Collapse and repair of replication forks in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 16(3):373–84.
20. **Kogoma T. 1997.** Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61(2):212–38.
21. **Jackson SP, Bartek J.** The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009 Okt 22;461(7267):1071–8.
22. **Dresser ME. 2000.** Meiotic chromosome behavior in *Saccharomyces cerevisiae* and (mostly) mammals. *Mutat. Res.*, 451(1-2):107–27.
23. **Rothkamm K, Kühne M, Jeggo PA, Löbrich M. 2001.** Radiation-induced genomic rearrangements formed by nonhomologous end-joining of DNA double-strand breaks. *Cancer Res.*, 61(10):3886–93.
24. **Gellert M, Hesse JE, Hiom K, Melek M, Modesti M, Paull TT, u. a. 1999.** V(D)J recombination: links to transposition and double-strand break repair. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 64:161–7.
25. **Morgan WF, Corcoran J, Hartmann A, Kaplan MI, Limoli CL, Ponnaiya B. 1998.** A double-strand breaks, chromosomal rearrangements, and genomic instability. *Mutat. Res.*, 404(1-2):125–8.
26. **Taccioli GE, Rathbun G, Oltz E, Stamato T, Jeggo PA, Alt FW. 1993.** Impairment of V(D)J recombination in double-strand break repair mutants. *Science*, 260(5105):207–10.
27. **Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M. 2003.** Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol. Cell. Biol.*, 23(16):5706–15.
28. **Herrmann T, Baumann M, Dörr W (eds). 2006.** *Klinische Strahlenbiologie: kurz und bündig*. 4. Aufl., Elsevier GmbH, München.
29. **Preston DL, Shimizu Y, Pierce DA, Suyama A, Mabuchi K. 2003.** Studies of mortality of atomic bomb survivors. Report 13: Solid cancer and noncancer disease mortality: 1950-1997. *Radiat. Res.*, 160(4):381–407.
30. **Brenner DJ, Doll R, Goodhead DT, Hall EJ, Land CE, Little JB, u. a. 2003.** Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*. 100(24):13761–6.



31. **Brenner DJ, Elliston CD. 2004.** Estimated radiation risks potentially associated with full-body CT screening. *Radiology*, 232(3):735–8.
32. **J. H. Karstens (ed). 2005** Strahlentherapie und Radioonkologie aus interdisziplinärer Sicht. 4. Aufl. Lehmanns Media-Lob.de.
33. **Mahrhofer H, Bürger S, Oppitz U, Flentje M, Djuzenova CS. 2006.** Radiation induced DNA damage and damage repair in human tumor and fibroblast cell lines assessed by histone H2AX phosphorylation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 64(2):573–80.
34. **Halperin EC, Perez CA, Brady LW, Wazer DE, Freeman C, Prosnitz LR (eds). 2007.** Perez and Brady's Principles and Practice of Radiation Oncology. 5nd ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
35. **Kao J, Milano MT, Javaheri A, Garofalo MC, Chmura SJ, Weichselbaum RR, u. a. 2006.** gamma-H2AX as a therapeutic target for improving the efficacy of radiation therapy. *Curr Cancer Drug Targets*, 6(3):197–205.
36. **López E, Guerrero R, Núñez MI, del Moral R, Villalobos M, Martínez-Galán J, u. a. 2005.** Early and late skin reactions to radiotherapy for breast cancer and their correlation with radiation-induced DNA damage in lymphocytes. *Breast Cancer Res.*, 7(5):R690–8.
37. **Popanda O, Ebbeler R, Twardella D, Helmbold I, Gotzes F, Schmezer P, u. a. 2003.** Radiation-induced DNA damage and repair in lymphocytes from breast cancer patients and their correlation with acute skin reactions to radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 55(5):1216–25.
38. **Vicini FA, Sharpe M, Kestin L, Martinez A, Mitchell CK, Wallace MF, u. a. 2002.** Optimizing breast cancer treatment efficacy with intensity-modulated radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 54(5):1336–44.
39. **Bentzen SM. 2006.** Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nat. Rev. Cancer.*, 6(9):702–13.
40. **Tureson I, Nyman J, Holmberg E, Odén A. 1996.** Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 36(5):1065–75.
41. **Rosen EM, Fan S, Rockwell S, Goldberg ID. 1999.** The molecular and cellular basis of radiosensitivity: implications for understanding how normal tissues and tumors respond to therapeutic radiation. *Cancer Invest.*, 17(1):56–72.
42. **Oppitz U, Denzinger S, Nachtrab U, Flentje M, Stopper H. 1999.** Radiation-induced comet-formation in human skin fibroblasts from radiotherapy patients with different normal tissue reactions. *Strahlenther Onkol.*, 175(7):341–6.
43. **Sprung CN, Chao M, Leong T, McKay MJ. 2005.** Chromosomal radiosensitivity in two cell lineages derived from clinically radiosensitive cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 11(17):6352–8.
44. **Pignol J-P, Olivotto I, Rakovitch E, Gardner S, Sixel K, Beckham W, u. a. 2008.** A multicenter randomized trial of breast intensity-modulated radiation therapy to reduce acute radiation dermatitis. *J. Clin. Oncol.* , 26(13):2085–92.

45. **Barber JB, Burrill W, Spreadborough AR, Levine E, Warren C, Kiltie AE, u. a. 2000.** Relationship between in vitro chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes and the expression of normal tissue damage following radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol.*, 55(2):179–86.
46. **Andreassen CN, Alsner J. 2009.** Genetic variants and normal tissue toxicity after radiotherapy: a systematic review. *Radiother Oncol.*, 92(3):299–309.
47. **Chang-Claude J, Popanda O, Tan X-L, Kropp S, Helmbold I, von Fournier D, u. a. 2005.** Association between polymorphisms in the DNA repair genes, XRCC1, APE1, and XPD and acute side effects of radiotherapy in breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 11(13):4802–9.
48. **Elting LS, Cooksley CD, Chambers MS, Garden AS. 2007.** Risk, outcomes, and costs of radiation-induced oral mucositis among patients with head-and-neck malignancies. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 68(4):1110–20.
49. **Fernando IN, Ford HT, Powles TJ, Ashley S, Glees JP, Torr M, u. a. 1996.** Factors affecting acute skin toxicity in patients having breast irradiation after conservative surgery: a prospective study of treatment practice at the Royal Marsden Hospital. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 8(4):226–33.
50. **Burnet NG, Johansen J, Turesson I, Nyman J, Peacock JH. 1998.** Describing patients' normal tissue reactions: concerning the possibility of individualising radiotherapy dose prescriptions based on potential predictive assays of normal tissue radiosensitivity. Steering Committee of the BioMed2 European Union Concerted Action Programme on the Development of Predictive Tests of Normal Tissue Response to Radiation Therapy. *Int. J. Cancer.*, 79(6):606–13.
51. **Ho AY, Atencio DP, Peters S, Stock RG, Formenti SC, Cesaretti JA, u. a. 2006.** Genetic predictors of adverse radiotherapy effects: the Gene-PARE project. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 65(3):646–55.
52. **Baumann M, Hölscher T, Begg AC. 2003.** Towards genetic prediction of radiation responses: ESTRO's GENEPI project. *Radiother Oncol.*, 69(2):121–5.
53. **Taylor AM, Metcalfe JA, Oxford JM, Harnden DG. 1976.** Proceedings: The radiosensitivity at the chromosomal level of lymphocytes from patients with ataxia telangiectasia. *Br J Radiol.*, 49(582):561.
54. **Gotoff SP, Amirmokri E, Liebner EJ. 1967.** Ataxia telangiectasia. Neoplasia, untoward response to x-irradiation, and tuberous sclerosis. *Am. J. Dis. Child.*, 114(6):617–25.
55. **Gatti RA. 2001.** The inherited basis of human radiosensitivity. *Acta Oncol.*, 40(6):702–11.
56. **Distel L, Neubauer S, Varon R, Holter W, Grabenbauer G. 2003.** Fatal toxicity following radio- and chemotherapy of medulloblastoma in a child with unrecognized Nijmegen breakage syndrome. *Med. Pediatr. Oncol.*, 41(1):44–8.
57. **Prise KM, Ahnström G, Belli M, Carlsson J, Frankenberg D, Kiefer J, u. a. 1998.** A review of dsb induction data for varying quality radiations. *Int. J. Radiat. Biol.*, 74(2):173–84.

58. **Iliakis GE, Cicilioni O, Metzger L. 1991.** Measurement of DNA double-strand breaks in CHO cells at various stages of the cell cycle using pulsed field gel electrophoresis: calibration by means of 125I decay. *Int. J. Radiat. Biol.*, 59(2):343–57.
59. **Fleckenstein J, Kühne M, Seegmüller K, Derschang S, Melchior P, Gräber S, u. a. 2010.** The Impact of Individual in vivo Repair of DNA Double-strand Breaks on Oral Mucositis in Adjuvant Radiotherapy of Head-and-Neck Cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, Article in Press.
60. **Löbrich M, Shibata A, Beucher A, Fisher A, Ensminger M, Goodarzi AA, u. a. 2010.** gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle*, 9(4):662–9.
61. **MacPhail SH, Banáth JP, Yu TY, Chu EHM, Lambur H, Olive PL. 2003.** Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.*, 79(5):351–8.
62. **Leatherbarrow EL, Harper JV, Cucinotta FA, O'Neill P. 2006.** Induction and quantification of gamma-H2AX foci following low and high LET-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 82(2):111–8.
63. **Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. 1999.** Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.*, 146(5):905–16.
64. **Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. 1998.** DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.*, 273(10):5858–68.
65. **Bouquet F, Muller C, Salles B. 2006.** The loss of gammaH2AX signal is a marker of DNA double strand breaks repair only at low levels of DNA damage. *Cell Cycle*, 5(10):1116–22.
66. **Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. 2008.** Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.*, 36(17):5678–94.
67. **Sauer R (ed). 2009.** Strahlentherapie und Onkologie. 5. Aufl. Elsevier GmbH, München.
68. **Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (edc). 2007.** Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag;
69. **Gatti RA, Boder E, Good RA. 2007.** Immunodeficiency, radiosensitivity, and the XCIND syndrome. *Immunol. Res.*, 38(1-3):87–101.
70. **Loyola A, Almouzni G. 2004.** Histone chaperones, a supporting role in the limelight. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1677(1-3):3–11.
71. **Misteli T. 2007.** Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell*, 128(4):787–800.
72. **Tremethick DJ. 2007.** Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber. *Cell*, 128(4):651–4.

73. **Li B, Carey M, Workman JL. 2007.** The role of chromatin during transcription. *Cell*, 128(4):707–19.
74. **Groth A, Rocha W, Verreault A, Almouzni G. 2007.** Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell*, 128(4):721–33.
75. **Li G, Widom J. 2004.** Nucleosomes facilitate their own invasion. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11(8):763–9.
76. **Lindahl T, Barnes DE. 2000.** Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb. Symp. Quant.*, 65:127–33.
77. **Rothkamm K, Balroop S, Shekhdar J, Fernie P, Goh V. 2007.** Leukocyte DNA damage after multi-detector row CT: a quantitative biomarker of low-level radiation exposure. *Radiology*, 242(1):244–51.
78. **Wannenmacher M, Debus J, Wenz F (edc). 2006.** Strahlentherapie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg;
79. **Löbrich M, Ikpe S, Kiefer J. 1994.** Measurement of DNA double-strand breaks in mammalian cells by pulsed-field gel electrophoresis: a new approach using rarely cutting restriction enzymes. *Radiat. Res.*, 138(2):186–92.
80. **Sak A, Grehl S, Erichsen P, Engelhard M, Grannass A, Levegrün S, u. a. 2007.** gamma-H2AX foci formation in peripheral blood lymphocytes of tumor patients after local radiotherapy to different sites of the body: dependence on the dose-distribution, irradiated site and time from start of treatment. *Int. J. Radiat. Biol.*, 83(10):639–52.
81. **Ward JF. 1995.** Radiation mutagenesis: the initial DNA lesions responsible. *Radiat. Res.*, 142(3):362–8.
82. **Friedland W, Jacob P, Paretzke HG, Merzagora M, Ottolenghi A. 1999.** Simulation of DNA fragment distributions after irradiation with photons. *Radiat Environ Biophys.*, 38(1):39–47.
83. **Kanaar R, Hoeijmakers JH, van Gent DC. 1998.** Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol.*, 8(12):483–9.
84. **Chu G. 1997.** Double strand break repair. *J. Biol. Chem.*, 272(39):24097–100.
85. **Núñez MI, Guerrero MR, López E, del Moral MR, Valenzuela MT, Siles E, u. a. 1998.** DNA damage and prediction of radiation response in lymphocytes and epidermal skin human cells. *Int. J. Cancer*, 76(3):354–61.
86. **Myung K, Kolodner RD. 2003.** Induction of genome instability by DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst.)*, 2(3):243–58.
87. **Zhang Y, Zhou J, Cao X, Zhang Q, Lim CUK, Ullrich RL, u. a. 2007.** Partial deficiency of DNA-PKcs increases ionizing radiation-induced mutagenesis and telomere instability in human cells. *Cancer Lett.*, 250(1):63–73.

88. **Lee T-K, Allison RR, O'Brien KF, Johnke RM, Christie KI, Naves JL, u. a. 2003.** Lymphocyte radiosensitivity correlated with pelvic radiotherapy morbidity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 57(1):222–9.
89. **Cornetta T, Festa F, Testa A, Cozzi R. 2006.** DNA damage repair and genetic polymorphisms: assessment of individual sensitivity and repair capacity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 66(2):537–45.
90. **Wang H, Wang M, Wang H, Böcker W, Iliakis G. 2005.** Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA-PK in human cells exposed to ionizing radiation and treated with kinase inhibitors. *J. Cell. Physiol.*, 202(2):492–502.
91. **Twardella D, Popanda O, Helmbold I, Ebbeler R, Benner A, von Fournier D, u. a. 2003.** Personal characteristics, therapy modalities and individual DNA repair capacity as predictive factors of acute skin toxicity in an unselected cohort of breast cancer patients receiving radiotherapy. *Radiother Oncol.*, 69(2):145–53.
92. **IAEA, Vienna. 2001.** Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment A Manual. Technical Report Series (405).
93. **Bauchinger M. 1995.** Quantification of low-level radiation exposure by conventional chromosome aberration analysis. *Mutat. Res.*, 339(3):177–89.
94. **Schwartz DC, Cantor CR. 1984.** Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*. 37(1):67–75.
95. **Wang W-D, Chen Z-T, Li D-Z, Cao Z-H, Pu P, Fu S-Z, u. a. 2005.** Detecting normal cell radiosensitivity via assay of DNA damage in lymphocytes for individualizing radiotherapy in head and neck cancer patients. *Oncology*. 69(3):208–13.
96. **Blöcher D. 1990.** In CHEF electrophoresis a linear induction of dsb corresponds to a nonlinear fraction of extracted DNA with dose. *Int. J. Radiat. Biol.*, 57(1):7–12.
97. **Rydberg B, Löbrich M, Cooper PK. 1994.** DNA double-strand breaks induced by high-energy neon and iron ions in human fibroblasts. I. Pulsed-field gel electrophoresis method. *Radiat. Res.*, 139(2):133–41.
98. **Kuefner MA, Grudzenski S, Schwab SA, Wiederseiner M, Heckmann M, Bautz W, u. a. 2009.** DNA double-strand breaks and their repair in blood lymphocytes of patients undergoing angiographic procedures. *Invest Radiol.*, 44(8):440–6.
99. **Geisel D, Heverhagen JT, Kalinowski M, Wagner H-J. 2008.** A double-strand breaks after percutaneous transluminal angioplasty. *Radiology*. 248(3):852–9.
100. **Kühne M, Riballo E, Rief N, Rothkamm K, Jeggo PA, Löbrich M. 2004.** A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity. *Cancer Res.*, 64(2):500–8.
101. **Ismail IH, Wadhwa TI, Hammarsten O. 2007.** An optimized method for detecting gamma-H2AX in blood cells reveals a significant interindividual variation in the gamma-H2AX response among humans. *Nucleic Acids Res.*, 35(5):e36.

102. **Rothkamm K, Horn S. 2009.** gamma-H2AX as protein biomarker for radiation exposure. *Ann. Ist. Super. Sanita.* 45(3):265–71.
103. **Sterpone S, Cornetta T, Padua L, Mastellone V, Giammarino D, Testa A, u. a. 2010.** DNA repair capacity and acute radiotherapy adverse effects in Italian breast cancer patients. *Mutat. Res.*, 684(1-2):43–8.
104. **Khanna KK, Jackson SP. 2001.** DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.*, 27(3):247–54.
105. **O’Driscoll M, Gennery AR, Seidel J, Concannon P, Jeggo PA. 2004.** An overview of three new disorders associated with genetic instability: LIG4 syndrome, RS-SCID and ATR-Seckel syndrome. *DNA Repair (Amst.)*, 3(8-9):1227–35.
106. **Mahaney BL, Meek K, Lees-Miller SP. 2009.** Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem. J.*, 417(3):639–50.
107. **Pfeiffer P, Goedecke W, Kuhfittig-Kulle S, Obe G. 2004.** Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberrations. *Cytogenet. Genome Res.*, 104(1-4):7–13.
108. **Jeggo PA. 1998.** Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiat. Res.*, 150(5 Suppl):S80–91.
109. **Gao Y, Ferguson DO, Xie W, Manis JP, Sekiguchi J, Frank KM, u. a. 2000.** Interplay of p53 and DNA-repair protein XRCC4 in tumorigenesis, genomic stability and development. *Nature*, 404(6780):897–900.
110. **Difilippantonio MJ, Zhu J, Chen HT, Meffre E, Nussenzweig MC, Max EE, u. a. 2000.** DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. *Nature*, 404(6777):510–4.
111. **Chang C, Biedermann KA, Mezzina M, Brown JM. 1993.** Characterization of the DNA double strand break repair defect in scid mice. *Cancer Res.*, 53(6):1244–8.
112. **Riballo E, Critchlow SE, Teo SH, Doherty AJ, Priestley A, Broughton B, u. a. 1999.** Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient. *Curr. Biol.*, 9(13):699–702.
113. **Wachsberger PR, Li WH, Guo M, Chen D, Cheong N, Ling CC, u. a. 1999.** Rejoining of DNA double-strand breaks in Ku80-deficient mouse fibroblasts. *Radiat. Res.*, 151(4):398–407.
114. **Hendrickson EA, Qin XQ, Bump EA, Schatz DG, Oettinger M, Weaver DT. 1991.** A link between double-strand break-related repair and V(D)J recombination: the scid mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88(10):4061–5.
115. **Wang H, Zeng ZC, Bui TA, Sonoda E, Takata M, Takeda S, u. a. 2001.** Efficient rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in vertebrate cells deficient in genes of the RAD52 epistasis group. *Oncogene*, 20(18):2212–24.

116. **Pastwa E, Neumann RD, Mezhevaya K, Winters TA. 2003.** Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks is dependent upon radiation quality and the structural complexity of double-strand breaks. *Radiat. Res.*, 159(2):251–61.
117. **Smith GC, Jackson SP. 1999.** The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.*, 13(8):916–34.
118. **Phillips JW, Morgan WF. 1994.** Illegitimate recombination induced by DNA double-strand breaks in a mammalian chromosome. *Mol. Cell. Biol.*, 14(9):5794–803.
119. **Haber JE. 2000.** Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet.*, 16(6):259–64.
120. **Thacker J. 1999.** A surfeit of RAD51-like genes? *Trends Genet.*, 15(5):166–8.
121. **Thompson LH, Schild D. 1999.** The contribution of homologous recombination in preserving genome integrity in mammalian cells. *Biochimie*, 81(1-2):87–105.
122. **Thompson LH, Schild D. 2001.** Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat. Res.*, 477(1-2):131–53.
123. **Sigurdsson S, Trujillo K, Song B, Stratton S, Sung P. 2001.** Basis for avid homologous DNA strand exchange by human Rad51 and RPA. *J. Biol. Chem.*, 276(12):8798–806.
124. **Baumann P, West SC. 1998.** Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *Trends Biochem. Sci.*, 23(7):247–51.
125. **Elliott B, Richardson C, Winderbaum J, Nickoloff JA, Jasin M. 1998.** Gene conversion tracts from double-strand break repair in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 18(1):93–101.
126. **Krogh BO, Symington LS. 2004.** Recombination proteins in yeast. *Annu. Rev. Genet.*, 38:233–71.
127. **Lisby M, Barlow JH, Burgess RC, Rothstein R. 2004.** Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell*, 118(6):699–713.
128. **Dronkert ML, Beverloo HB, Johnson RD, Hoeijmakers JH, Jasin M, Kanaar R. 2000.** Mouse RAD54 affects DNA double-strand break repair and sister chromatid exchange. *Mol. Cell. Biol.*, 20(9):3147–56.
129. **Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W. 2002.** Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 12(2):162–9.
130. **Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, Bonner WM. 2002.** Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat. Res.*, 158(4):486–92.
131. **Pilch DR, Sedelnikova OA, Redon C, Celeste A, Nussenzweig A, Bonner WM. 2003.** Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. *Biochem. Cell Biol.*, 81(3):123–9.

132. **Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM. 2000.** A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.*, 10(15):886–95.
133. **Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. 2001.** ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.*, 276(45):42462–7.
134. **Andegeko Y, Moyal L, Mittelman L, Tsarfaty I, Shiloh Y, Rotman G. 2001.** Nuclear retention of ATM at sites of DNA double strand breaks. *J. Biol. Chem.*, 276(41):38224–30.
135. **Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Löbrich M, Jeggo PA. 2004.** ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.*, 64(7):2390–6.
136. **Bakkenist CJ, Kastan MB. 2003.** DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421(6922):499–506.
137. **Hickson I, Zhao Y, Richardson CJ, Green SJ, Martin NMB, Orr AI, u. a. 2004.** Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer Res.*, 64(24):9152–9.
138. **Friesner JD, Liu B, Culligan K, Britt AB. 2005.** Ionizing radiation-dependent gamma-H2AX focus formation requires ataxia telangiectasia mutated and ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related. *Mol. Biol. Cell*, 16(5):2566–76.
139. **Veuger SJ, Curtin NJ, Smith GCM, Durkacz BW. 2004.** Effects of novel inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and the DNA-dependent protein kinase on enzyme activities and DNA repair. *Oncogene*, 23(44):7322–9.
140. **Pollard JM, Gatti RA. 2009.** Clinical radiation sensitivity with DNA repair disorders: an overview. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 74(5):1323–31.
141. **BODER E, SEDGWICK RP. 1958.** Ataxia-telangiectasia; a familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia and frequent pulmonary infection. *Pediatrics*, 21(4):526–54.
142. **Chun HH, Gatti RA. 2004.** Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype. *DNA Repair (Amst.)*, 3(8-9):1187–96.
143. **Swift M, Morrell D, Cromartie E, Chamberlin AR, Skolnick MH, Bishop DT. 1986.** The incidence and gene frequency of ataxia-telangiectasia in the United States. *Am. J. Hum. Genet.*, 39(5):573–83.
144. **Gatti RA, Berkel I, Boder E, Braedt G, Charmley P, Concannon P, u. a. 1988.** Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature*, 336(6199):577–80.
145. **Savitsky K, Sfez S, Tagle DA, Ziv Y, Sarti A, Collins FS, u. a. 1995.** The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum. Mol. Genet.*, 4(11):2025–32.



146. **Lange E, Borresen AL, Chen X, Chessa L, Chiplunkar S, Concannon P, u. a. 1995.** Localization of an ataxia-telangiectasia gene to an approximately 500-kb interval on chromosome 11q23.1: linkage analysis of 176 families by an international consortium. *Am. J. Hum. Genet.*, 57(1):112–9.
147. **Löbrich M, Jeggo PA. 2005.** The two edges of the ATM sword: co-operation between repair and checkpoint functions. *Radiother Oncol.*, 76(2):112–8.
148. **Hiel JA, Weemaes C, Van den Heuvel IP. 2000.** Nijmegen breakage syndrome. The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group. *Arch. Dis. Child.*, 82(5):400–6.
149. **Taalman RD, Jaspers NG, Scheres JM, de Wit J, Hustinx TW., 1983.** Hypersensitivity to ionizing radiation, in vitro, in a new chromosomal breakage disorder, the Nijmegen Breakage Syndrome. *Mutat. Res.*, 112(1):23–32.
150. **Jaspers NG, Gatti RA, Baan C, Linssen PC, Bootsma D. 1988.** Genetic complementation analysis of ataxia telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome: a survey of 50 patients. *Cytogenet. Cell Genet.*, 49(4):259–63.
151. **Lobitz S, Velleuer E. Guido Fanconi. 2006.** (1892-1979): a jack of all trades. *Nat. Rev. Cancer*, 6(11):893–8.
152. **Fanconi G. 1927.** Familiäre infantile perniziosaartige Anaemie (pernizioeses Blutbild und Konstitution). *Jahrb. Kinderheilkund*, 117:257-280.
153. **Harper JL, Jenrette JM, Goddu SM, Lal A, Smith T. 2004.** Vulvar cancer in a patient with Fanconi's anemia, treated with 3D conformal radiotherapy. *Am. J. Hematol.*, 76(2):148–51.
154. **Oksüzoğlu B, Yalçın S. 2002.** Squamous cell carcinoma of the tongue in a patient with Fanconi's anemia: a case report and review of the literature. *Ann. Hematol.*, 81(5):294–8.
155. **Djuzenova C, Flentje M, Plowman PN. 2004.** Radiation response in vitro of fibroblasts from a fanconi anemia patient with marked clinical radiosensitivity. *Strahlenther Onkol.*, 180(12):789–97.
156. **Jacquemont C, Taniguchi T. 2007.** The Fanconi anemia pathway and ubiquitin. *BMC Biochem.*, 8 Suppl 1:S10.
157. **Gruhn B, Seidel J, Zintl F, Varon R, Tönnies H, Neitzel H, u. a. 2007.** Successful bone marrow transplantation in a patient with DNA ligase IV deficiency and bone marrow failure. *Orphanet J Rare Dis.*, 2:5.
158. **O'Driscoll M, Cerosaletti KM, Girard PM, Dai Y, Stumm M, Kysela B, u. a. 2001.** DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol. Cell*, 8(6):1175–85.
159. **Plowman PN, Bridges BA, Arlett CF, Hinney A, Kingston JE. 1990.** An instance of clinical radiation morbidity and cellular radiosensitivity, not associated with ataxia-telangiectasia. *Br J Radiol.*, 63(752):624–8.

160. **Klaus G, Cornelia H, Katrin J, Cornelia L (edc). 2005.** RKI Themenhefte, Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Brustkrebs, Heft 25. Robert-Koch-Institut, Berlin.
161. **Ziegler H, roland S, Bernd H, Christa S (eds). 2008.** Atlas der Inzidenz und Mortalität 1997-2006 und Bericht für die Jahre 2004-2006. Epidemiologisches Krebsregister Saarland, Ministerium f. Justiz, Arbeit, Gesundheit und Soziales, Saarbrücken.
162. **Diedrich K, Schultze-Mosgau A, Holzgreve W, Jonat W, Schneider K-TM, Weiss JM (eds). 2007.** Gynäkologie und Geburtshilfe-Das Mammakarzinom. Springer Berlin, Heidelberg.
163. **Lohr F, Wenz F. (eds). 2007.** Strahlentherapie kompakt: Mammakarzinom. 2. Aufl. Elsevier GmbH, München, pp 1-29.
164. **Sauer R, Organgruppe „Mammakarzinom“ der DEGRO.2006 (eds). 2006.** Leitlinie: Radiotherapie des Mammakarzinoms (DEGRO 2005), Strahlentherapie und Onkol., 182: Supplement I.
165. **Gabka CJ. 2005.** Operative Therapie des primären Mammakarzinoms, 95–101.
166. **Bhogal N, Kaspler P, Jalali F, Hyrien O, Chen R, Hill RP, u. a. 2010.** Late residual gamma-H2AX foci in murine skin are dose responsive and predict radiosensitivity in vivo. Radiat. Res., 173(1):1–9.
167. **Fisher ER, Dignam J, Tan-Chiu E, Costantino J, Fisher B, Paik S, u. a. 1999.** Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (NSABP) eight-year update of Protocol B-17: intraductal carcinoma. Cancer, 86(3):429–38.
168. **Julien JP, Bijker N, Fentiman IS, Peterse JL, Delledonne V, Rouanet P, u. a. 2000.** Radiotherapy in breast-conserving treatment for ductal carcinoma in situ: first results of the EORTC randomised phase III trial 10853. EORTC Breast Cancer Cooperative Group and EORTC Radiotherapy Group. Lancet, 355(9203):528–33.
169. **Hehr T. 2002.** Strahlentherapie des Mammakarzinoms. (8):853–66.
170. **Hammer J, Track C, Seewald DH, Spiegl KJ, Feichtinger J, Petzer AL, u. a. 2009.** Local relapse after breast-conserving surgery and radiotherapy: effects on survival parameters. Strahlenther Onkol., 185(7):431–7.
171. **Schaffer P. 2005.** Radioonkologische Behandlung. 110–9.
172. **Kreienberg R, Kopp I, Albert U u.a. (eds). 2008.** Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Zuckschwerdt Verlag GmbH, Germering, München.
173. **Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans E, u. a. 2005.** Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. Lancet, 366(9503):2087–106.
174. **Whelan T, MacKenzie R, Julian J, Levine M, Shelley W, Grimard L, u. a. 2002.** Randomized trial of breast irradiation schedules after lumpectomy for women with lymph node-negative breast cancer. J. Natl. Cancer Inst., 94(15):1143–50.

175. **Van de Steene J, Soete G, Storme G. 2000.** Adjuvant radiotherapy for breast cancer significantly improves overall survival: the missing link. *Radiother Oncol.*, 55(3):263–72.
176. **Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, u. a. 2002.** Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 347(16):1233–41.
177. **Bartelink H, Horiot JC, Poortmans P, Struikmans H, Van den Bogaert W, Barillot I, u. a. 2001.** Recurrence rates after treatment of breast cancer with standard radiotherapy with or without additional radiation. *N. Engl. J. Med.*, 345(19):1378–87.
178. **Recht A. 2003.** Integration of systemic therapy and radiation therapy for patients with early-stage breast cancer treated with conservative surgery. *Clin. Breast Cancer*, 4(2):104–13.
179. **Recht A, Come SE, Henderson IC, Gelman RS, Silver B, Hayes DF, u. a. 1996.** The sequencing of chemotherapy and radiation therapy after conservative surgery for early-stage breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 334(21):1356–61.
180. **Jung H, Beck-Bornholdt HP, Svoboda V, Alberti W, Herrmann T. 2001.** Quantification of late complications after radiation therapy. *Radiother Oncol.*, 61(3):233–46.
181. **Bentzen, Overgaard. 1994.** Patient-to-Patient Variability in the Expression of Radiation-Induced Normal Tissue Injury. *Semin Radiat Oncol.*, 4(2):68–80.
182. **Tucker SL, Turesson I, Thames HD. 1992.** Evidence for individual differences in the radiosensitivity of human skin. *Eur. J. Cancer*. 28A(11):1783–91.
183. **Wang J, Boerma M, Fu Q, Hauer-Jensen M. 2007.** Significance of endothelial dysfunction in the pathogenesis of early and delayed radiation enteropathy. *World J. Gastroenterol.*, 13(22):3047–55.
184. **Yang K, Palm J, König J, Seeland U, Rosenkranz S, Feiden W, u. a. 2007.** Matrix-Metallo-Proteinases and their tissue inhibitors in radiation-induced lung injury. *Int. J. Radiat. Biol.*, 83(10):665–76.
185. **Rübe CE, Uthe D, Wilfert F, Ludwig D, Yang K, König J, u. a. 2005.** The bronchiolar epithelium as a prominent source of pro-inflammatory cytokines after lung irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 61(5):1482–92.
186. **Porock D. 2002.** Factors influencing the severity of radiation skin and oral mucosal reactions: development of a conceptual framework. *Eur J Cancer Care (Engl)*, 11(1):33–43.
187. **Harper JL, Franklin LE, Jenrette JM, Aguero EG.** Skin toxicity during breast irradiation: pathophysiology and management. *South. Med. J.*, 97(10):989–93.
188. **Pires AMT, Segreto RA, Segreto HRC. 2008.** RTOG criteria to evaluate acute skin reaction and its risk factors in patients with breast cancer submitted to radiotherapy. *Rev Lat Am Enfermagem*, 16(5):844–9.

189. **Röper B, Kaisig D, Auer F, Mergen E, Molls M. 2004.** Thêta-Cream versus Bepanthol lotion in breast cancer patients under radiotherapy. A new prophylactic agent in skin care? *Strahlenther Onkol.*, 180(5):315–22.
190. **Cox JD, Stetz J, Pajak TF. 1995.** Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 31(5):1341–6.
191. **Richik NG u.a. 2007.** New DyLight™ Fluorescence Dyes for High Content Screening and Fluorescence Cell-Based Assays. Thermo Scientific, Cellomics & Pierce, Rockford, Illionis, USA.
192. **Wilson WD, Tanious FA, Barton HJ, Jones RL, Fox K, Wydra RL, u. a. 1990.** DNA sequence dependent binding modes of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Biochemistry*, 29(36):8452–61.
193. **Invitrogen Molecular Probes. 2006.** DAPI Nucleic Acid Stain. UK.
194. **Vector Laboratories.** Vector Laboratories Produktinformation Vektashield Mounting Medium mit DAPI. USA.
195. **Yokota Y, Wada S, Hase Y, Funayama T, Kobayashi Y, Narumi I, u. a. 2009.** Kinetic analysis of double-strand break rejoining reveals the DNA reparability of gamma-irradiated tobacco cultured cells. *J. Radiat. Res.*, 50(2):171–5.
196. **Savage JRK. 1970.** Sites of radiation induced chromosome exchanges. (6):129–94.
197. **Radhakrishna R. 1956.** Some small sample tests of significance for a poisson distribution. (12):264–82.
198. **Edwards AA, Lloyd DC, Purrott RJ. 1979.** Radiation induced chromosome aberrations and the Poisson distribution. *Radiat Environ Biophys.*, 16(2):89–100.
199. **Lloyd DC, Edwards AA, Prosser JS, Barjaktarovic N, Brown JK, Horvat D, u. a. 1987.** A collaborative exercise on cytogenetic dosimetry for simulated whole and partial body accidental irradiation. *Mutat. Res.*, 179(2):197–208.
200. **López E, Núñez MI, Guerrero MR, del Moral R, de Dios Luna J, del Mar Rodríguez M, u. a. 2002.** Breast cancer acute radiotherapy morbidity evaluated by different scoring systems. *Breast Cancer Res. Treat.*, 73(2):127–34.
201. **Borgmann K, Röper B, El-Awady R, Brackrock S, Bigalke M, Dörk T, u. a. 2002.** Indicators of late normal tissue response after radiotherapy for head and neck cancer: fibroblasts, lymphocytes, genetics, DNA repair, and chromosome aberrations. *Radiother Oncol.*, 64(2):141–52.
202. **Rübe CE, Fricke A, Wendorf J, Stützel A, Kühne M, Ong MF, u. a. 2010.** Accumulation of DNA double-strand breaks in normal tissues after fractionated irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 76(4):1206–13.
203. **Rübe CE, Fricke A, Schneider R, Simon K, Kühne M, Fleckenstein J, u. a. 2010.** DNA repair alterations in children with pediatric malignancies: novel opportunities to identify patients at risk for high-grade toxicities. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 78(2):359–69.

204. **Rübe CE, Lorat Y, Schuler N, Schanz S, Wennemuth G, Rübe C. 2011.** DNA repair in the context of chromatin: new molecular insights by the nanoscale detection of DNA repair complexes using transmission electron microscopy. *DNA Repair (Amst.)*, 10(4):427–37.
205. **Bhogal N, Jalali F, Bristow RG. 2009.** Microscopic imaging of DNA repair foci in irradiated normal tissues. *Int. J. Radiat. Biol.*, 85(9):732–46.
206. **Rübe CE, Dong X, Kühne M, Fricke A, Kaestner L, Lipp P, u. a. 2008.** DNA double-strand break rejoining in complex normal tissues. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 72(4):1180–7.
207. **Rübe CE, Grudzenski S, Kühne M, Dong X, Rief N, Löbrich M, u. a. 2008.** DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model: implications for radiosensitivity testing. *Clin. Cancer Res.*, 14(20):6546–55.
208. **Ward IM, Chen J. 2001.** Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J. Biol. Chem.*, 276(51):47759–62.
209. **McManus KJ, Hendzel MJ. 2005.** ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells. *Mol. Biol. Cell.*, 16(10):5013–25.
210. **Mukherjee B, Kessinger C, Kobayashi J, Chen BPC, Chen DJ, Chatterjee A, u. a. 2006.** DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair (Amst.)*, 5(5):575–90.
211. **Costes SV, Boissière A, Ravani S, Romano R, Parvin B, Barcellos-Hoff MH. 2006.** Imaging features that discriminate between foci induced by high- and low-LET radiation in human fibroblasts. *Radiat. Res.*, 165(5):505–15.
212. **Nakamura AJ, Rao VA, Pommier Y, Bonner WM. 2010.** The complexity of phosphorylated H2AX foci formation and DNA repair assembly at DNA double-strand breaks. *Cell Cycle*, 9(2):389–97.
213. **Jakob B, Splinter J, Taucher-Scholz G. 2009.** Positional stability of damaged chromatin domains along radiation tracks in mammalian cells. *Radiat. Res.*, 171(4):405–18.
214. **Kegel P, Riballo E, Kühne M, Jeggo PA, Löbrich M. 2007.** X-irradiation of cells on glass slides has a dose doubling impact. *DNA Repair (Amst.)*, 6(11):1692–7.
215. **Schmid E. 2002.** Is there reliable experimental evidence for a low-dose RBE of about 4 for mammography X rays relative to 200 kV X rays? *Radiat. Res.*, 158(6):778–81.
216. **Frankenberg D, Kelnhofer K, Bär K, Frankenberg-Schwager M. 2002.** Enhanced neoplastic transformation by mammography X rays relative to 200 kVp X rays: indication for a strong dependence on photon energy of the RBE(M) for various end points. *Radiat. Res.*, 157(1):99–105.
217. **Kühne M, Urban G, Frankenberg D, Löbrich M. 2005.** DNA double-strand break misrejoining after exposure of primary human fibroblasts to CK characteristic X rays, 29 kVp X rays and 60Co gamma rays. *Radiat. Res.*, 164(5):669–76.

218. **Borgmann K, Hoeller U, Nowack S, Bernhard M, Röper B, Brackrock S, u. a. 2008.** Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may predict the risk of acute reaction after radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 71(1):256–64.
219. **Werbrouck J, De Ruyck K, Beels L, Vral A, Van Eijkeren M, De Neve W, u. a. 2010.** Prediction of late normal tissue complications in RT treated gynaecological cancer patients: potential of the gamma-H2AX foci assay and association with chromosomal radiosensitivity. *Oncol. Rep.*, 23(2):571–8.
220. **Hoeller U, Borgmann K, Bonacker M, Kuhlmei A, Bajrovic A, Jung H, u. a. 2003.** Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may be used to predict the risk of fibrosis after radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol.*, 69(2):137–44.
221. **Begg AC, Russell NS, Knaken H, Lebesque JV. 1993.** Lack of correlation of human fibroblast radiosensitivity in vitro with early skin reactions in patients undergoing radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.*, 64(4):393–405.
222. **Geara FB, Peters LJ, Ang KK, Wike JL, Brock WA. 1993.** Prospective comparison of in vitro normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 27(5):1173–9.
223. **Brock WA, Tucker SL, Geara FB, Turesson I, Wike J, Nyman J, u. a. 1995.** Fibroblast radiosensitivity versus acute and late normal skin responses in patients treated for breast cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 32(5):1371–9.
224. **El-Awady RA, Mahmoud M, Saleh EM, El-Baky HA, Lotayef M, Dahm-Daphi J, u. a. 2005.** No correlation between radiosensitivity or double-strand break repair capacity of normal fibroblasts and acute normal tissue reaction after radiotherapy of breast cancer patients. *Int. J. Radiat. Biol.*, 81(7):501–8.
225. **Oppitz U, Baier K, Wulf J, Schakowski R, Flentje M. 2001.** The in vitro colony assay: a predictor of clinical outcome. *Int. J. Radiat. Biol.*, 77(1):105–10.
226. **Oppitz U, Schulte S, Stopper H, Baier K, Müller M, Wulf J, u. a. 2002.** In vitro radiosensitivity measured in lymphocytes and fibroblasts by colony formation and comet assay: comparison with clinical acute reactions to radiotherapy in breast cancer patients. *Int. J. Radiat. Biol.*, 78(7):611–6.
227. **Dikomey E, Borgmann K, Peacock J, Jung H. 2003.** Why recent studies relating normal tissue response to individual radiosensitivity might have failed and how new studies should be performed. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 56(4):1194–200.
228. **Alapetite C, Thirion P, de la Rochefordière A, Cosset JM, Moustacchi E. 1999.** Analysis by alkaline comet assay of cancer patients with severe reactions to radiotherapy: defective rejoining of radioinduced DNA strand breaks in lymphocytes of breast cancer patients. *Int. J. Cancer*, 83(1):83–90.
229. **Denham JW, Hamilton CS, Simpson SA, Ostwald PM, O'Brien M, Kron T, u. a. 1995.** Factors influencing the degree of erythematous skin reactions in humans. *Radiother Oncol.*, 36(2):107–20.
230. **Djuzenova CS, Schindler D, Stopper H, Hoehn H, Flentje M, Oppitz U. 1999.** Identification of ataxia telangiectasia heterozygotes, a cancer-prone population, using the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Lab. Invest*, 79(6):699–705.

- 231. **Archambeau JO, Pezner R, Wasserman T. 1995.** Pathophysiology of irradiated skin and breast. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 31(5):1171–85.
- 232. **Albino AP, Huang X, Jorgensen E, Yang J, Gietl D, Traganos F, u. a. 2004.** Induction of H2AX phosphorylation in pulmonary cells by tobacco smoke: a new assay for carcinogens. *Cell Cycle*, 3(8):1062–8.
- 233. **Kato T, Nagasawa H, Warner C, Okayasu R, Bedford JS. 2007.** Cytotoxicity of cigarette smoke condensate is not due to DNA double strand breaks: Comparative studies using radiosensitive mutant and wild-type CHO cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 83(9):583–91.

## 8. Publikationen

- 2006     *Fleckenstein J. , Kühne M. , **Melchior P.** , Bungert H. , Strobel M. , Rief N. , Löbrich M. , Rübe Ch. (2006) Posterpräsentation auf der DEGRO*  
Untersuchungen zum Stellenwert der individuellen in vivo Reparatur von strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen in der Strahlentherapie von Patientinnen mit Mammakarzinom
- 2010     Jochen Fleckenstein, Martin Kühne, Katharina Seegmüller ,Sarah Derschang, **Patrick Melchior**, Stefan Gräber, Christian Rübe  
The Impact of Individual in vivo Repair of DNA Double-Strand Breaks on oral Mucositis in adjuvant Radiotherapy of Head And Neck Cancer. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., 2010 article in press



## 9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Christian Rübe, Direktor der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums des Saarlandes für die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit und die bisherige Förderung meines wissenschaftlichen und beruflichen Interesses und Werdeganges.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jochen Fleckenstein, Geschäftsführender Oberarzt der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, für die stete engagierte Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, Unterstützung und Motivation für die Bearbeitung des Themas.

Weiterhin danke ich Frau PD Dr. med. Claudia Rübe, Leiterin des Labor für Strahlenbiologie und Herrn Professor Dr. Markus Löbrich, ehemaliger Direktor des Instituts für Biophysik des Universitätsklinikums des Saarlandes für die Bereitstellung des Laborinventars, die gute Zusammenarbeit und ständige Diskussionsbereitschaft.

Außerdem möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Martin Kühne für die Mitbetreuung und Hilfe bei der praktischen Durchführung der Experimente und dessen Vorbereitung danken. Ein weiterer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Andreas Fricke für die Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse sowie Daniela Ludwig und Roswitha Schepp für die tatkräftige Unterstützung im Labor der Strahlenbiologie und Biophysik. Außerdem bedanke ich mich bei meinen Studienkollegen Matthias Strobel und Henning Bungert der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Fleckenstein für die Motivation, den Gedankenaustausch und die Hilfestellung beim praktischen Teil der Arbeit.

Allen Mitarbeitern der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie und dem Labor für Strahlenbiologie danke ich für die diversen Hilfestellungen, wissenschaftlichen Diskussionen und das gute Arbeitsklima.

Der wohl größte Dank gilt meiner Familie, meinen Geschwistern Pascal und Sonja und meinen Freunden, welche alle auf ihre Weise zu dem Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Danke an meine Eltern Gabriele und Thomas Melchior für die Ermöglichung des Medizinstudiums und die stetige Begleitung und Unterstützung auf all meinen Lebenswegen.

Ich danke besonders ganz herzlich meiner Ehefrau Karina und meinem Sohn Julian, die mich während der ganzen Zeit stets moralisch unterstützt und motiviert haben. Außerdem möchte ich mich bei meinem Bruder Pascal Melchior für die unentbehrliche Hilfe, die große Diskussionsbereitschaft und den wissenschaftlichen Gedankenaustausch bedanken, der wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

## 10. Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name	Patrick Wilhelm Melchior
Wohnort	Mühlstr.19 in 66894 Bechhofen
Geburtsdatum und -ort	20.12.1979 in Saarbrücken
Familienstand	verheiratet
Nationalität	Deutsch

### Berufsausbildung

07/1999 - 10/1999	Ausbildung zum Rettungssanitäter
10/2000 - 03/2003	Vorklinisches Studium der Medizin an der Universitätsklinik des Saarlandes mit Abschluss der ärztlichen Vorprüfung 03/2003 mit der Note 2,66
03/2003 - 02/2006	Klinisches Studium der Medizin an der Universitätsklinik des Saarlandes
02/2006 - 01/2007	Praktisches Jahr im Städtischen Krankenhaus in Neunkirchen in den Bereichen Innere Medizin und Chirurgie, sowie an der Universitätsklinik des Saarlandes im Wahlfach Strahlentherapie und Radioonkologie
06/2007	Ärztliche Prüfung an der Universitätsklinik des Saarlandes mit der Note 2,0
Seit 08/2007	Assistenzarzt an der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg-Saar
02/2010 - 05/2010	Basiskurs für die Zusatzbezeichnung Palliativmedizin

### Studienbegleitende Tätigkeiten

Famulaturen	
08/2002 - 12/2002	4-monatiger Auslandsaufenthalt in Brasilien mit Praktikum im Krankenhaus Santa Casa de Maringá der „Barmherzigen Brüder“ von Trier in den Bereichen Pädiatrie, Orthopädie, Anästhesie
08/2003 - 09/2003	Famulatur Anästhesiologie / Praxis André - Bommert, Neunkirchen-Wiebelskirchen
09/2003 - 10/2003	Auslandsfamulatur Chirurgie / Krankenhaus Santa Casa de Maringá in Brasilien
03/2004 - 04/2004	Famulatur Innere Medizin / Städtisches Klinikum in Neunkirchen
08/2004 - 09/2004	Famulatur Anästhesiologie / Praxis André-Bommert, Neunkirchen -Wiebelskirchen

**Nebentätigkeiten**

2000 - 2002	Ehrenamtliche Tätigkeiten als Rettungssanitäter beim Arbeiter-Samariter-Bund in Neunkirchen und Brebach - Saarbrücken
01/ 2002 - 02/2007	Studententätigkeit bei der Deutschen Stiftung für Organtransplantation (DSO) Organisationsbereich Mainz/ Homburg als Perfusionsstudent
10/ 2000 – 07/2001	Teilnahme am Kurs „Anamnesegruppe“ zur Erlernung der Führung des ärztlichen Gesprächs
10/ 2001 - 07/2002	Leitung als studentische Hilfskraft von zwei studentischen Anamnesegruppen
Seit 04/2010	Lehrtätigkeit im Fach Strahlentherapie an der staatlich anerkannten Schule für Medizinisch-Technische RadiologieassistentInnen des UKS, Homburg-Saar
Seit 10/2010	Assistentensprecher der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, UKS Homburg-Saar

**Fremdsprachen**

Grundkenntnisse in Englisch, Französisch und fließend Brasilianisch-Portugiesisch

Bechhofen im September 2011

Patrick Melchior